

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 33/569, C07K 14/74, G01N 33/68, C12N 5/06, 5/08, C07K 16/28, C12N 5/12, A61K 38/17		A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/44667 (43) Date de publication internationale: 27 novembre 1997 (27.11.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00892 (22) Date de dépôt international: 21 mai 1997 (21.05.97) (30) Données relatives à la priorité: 08/651,925 21 mai 1996 (21.05.96) US (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25, rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15 (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LANGLADE- DEMOYEN, Pierre [FR/FR]; 18, rue B. Shaw, F-75015 Paris (FR). LONE, Yu-Chun [FR/FR]; 11, rue Béliard, F-75017 Paris (FR). KOURILSKY, Philippe [FR/FR]; 26, rue de Montpensier, F-75001 Paris (FR). ABASTADO, Jean-Pierre [FR/FR]; 33, rue de Croustadt, F-75015 Paris (FR). (74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Ainé, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.	
(54) Title: METHOD FOR USING PEPTIDE COMPLEXES/MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX TO OBTAIN OR PURIFY ANTIGEN-SPECIFIC T CELLS AND TO STIMULATE T CELLS (54) Titre: METHODES D'UTILISATION DE COMPLEXES PEPTIDE/COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE POUR OBTENIR OU PURIFIER DES CELLULES T ANTIGENE-SPECIFIQUES ET POUR STIMULER DES CELLULES T (57) Abstract <p>The invention features methods for using MHC/peptide complexes. The successful peptide-specific T lymphocyte purification by adsorption on a solid support coupled with a high density of MHC recombinant molecules, charged with a single peptide is disclosed. This method has enabled the isolating, purifying and quantifying of tumoral specific T lymphocytes, from peritoneal exudate and tumor-infiltrating lymphocytes. These purified T lymphocyte populations can be further multiplied <i>in vitro</i>. The resulting cells show a superior cytotoxic activity and an enhanced anti-tumoral action by re-injection in the tumor carrier. This novel approach is important for analysing the T lymphocytes repertoire at the peptide specificity level and to improve novel T lymphocyte adoptive immunotherapy based therapeutic treatments. Further, the MHC/peptide specific complexes can induce or stimulate peptide-specific T lymphocytes. Thus are also disclosed methods to induce cytotoxic T lymphocytes (CTL). These CTL can be used in turn to fight tumoral cell growth <i>in vitro</i> or <i>in vivo</i>. The MHC recombinant molecule charged with a single peptide can be effectively used in polymer form to stimulate specific immune response <i>ex vivo</i> or <i>in vivo</i> after being injected in man or animal.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne des méthodes d'utilisation de complexes CMH/peptide. On décrit la purification réussie de lymphocytes T peptide-spécifiques par adsorption sur un support solide couplé à une densité élevée de molécules recombinantes du CMH, chargées d'un seul peptide. Cette méthode a permis d'isoler, purifier et quantifier des lymphocytes T spécifiques de tumeur, à partir d'échantillons d'exsudat péritonéal et de lymphocytes infiltrant des tumeurs. Ces populations de lymphocytes T purifiés peuvent être encore multipliées <i>in vitro</i>. Les cellules résultantes présentent une activité cytotoxique supérieure et une action anti-tumorale accrue par réinjection au porteur de la tumeur. Cette nouvelle approche est importante pour analyser le répertoire de lymphocytes T au niveau de la spécificité peptidique et pour améliorer de nouveaux traitements thérapeutiques basés sur l'immunothérapie adoptive à lymphocytes T. De plus, les complexes spécifiques CMH/peptide peuvent induire ou stimuler des lymphocytes T peptide-spécifiques. Ainsi, on décrit également des méthodes destinées à induire des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Ces CTL peuvent être utilisés à leur tour pour combattre la croissance des cellules tumorales <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i>. La molécule CMH recombinante chargée avec un seul peptide peut être utilisée avec efficacité sous forme polymère pour stimuler une réponse immune spécifique <i>ex vivo</i> ou <i>in vivo</i> après injection à l'homme ou l'animal.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovenie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaidjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	VU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Méthodes d'utilisation de complexes peptide/complexe
5 majeur d'histocompatibilité pour obtenir ou purifier
des cellules T antigène-spécifiques
et pour stimuler des cellules T.

10

ARRIERE-PLAN DE L'INVENTION

La présente invention fournit des compositions
comprenant un antigène ou molécule du complexe majeur
d'histocompatibilité (CMH) conjointement avec un antigène
15 peptidique et des méthodes pour utiliser ces compositions
lorsqu'elles sont liées à un support solide. Dans un mode de
réalisation, l'invention fournit des méthodes pour obtenir,
purifier et/ou multiplier une population de lymphocytes T
qui sont spécifiques d'un antigène peptidique particulier.
20 Diverses utilisations des lymphocytes T obtenus sont
également décrites. Dans un autre mode de réalisation,
l'invention fournit des méthodes pour induire ou stimuler
des lymphocytes T pour répondre à un antigène spécifique.
Les modes de réalisation préférés comprennent des méthodes
25 pour purifier des lymphocytes T cytotoxiques et des méthodes
pour activer ou induire la réponse d'un lymphocyte T
cytotoxique, générant ainsi un lymphocyte T cytotoxique
spécifique d'un antigène.

Les principaux concepts de la reconnaissance des lymphocytes T et du répertoire des lymphocytes T fournissent un arrière-plan pour comprendre la présente invention et ses utilisations. On sait que les lymphocytes T reconnaissent des fragments antigéniques portés par la surface d'une cellule présentatrice d'antigène en association avec des produits des gènes du CMH de classe I ou de classe II (1). La liaison aux récepteurs de cellule T fait partie du processus de reconnaissance.

On sait également que la population totale de lymphocytes T d'un seul animal peut reconnaître plusieurs millions de spécificités différentes, une seule spécificité pouvant être définie comme un peptide lié à une molécule du CMH. La reconnaissance d'un tel nombre de spécificités est réalisée par la recombinaison aléatoire de différents segments de gènes, suivie par la sélection clonale (2). En raison de l'étendue du répertoire des lymphocytes T et du nombre total limité de lymphocytes T, seul un petit nombre de lymphocytes T sont dirigés contre une spécificité donnée. Ce nombre peut être augmenté chez des animaux immunisés de façon répétée, mais il reste relativement faible (3). En raison du petit nombre de lymphocytes T dirigés contre un antigène particulier, il est difficile d'identifier des moyens efficaces pour purifier in vitro un lymphocyte T d'une spécificité donnée.

Les répertoires de lymphocytes T ont été étudiés afin de tenter de mesurer la diversité du répertoire et l'expansion clonale dans des échantillons sains et cliniques (pour une revue, voir (4)). Un certain progrès a été réalisé par le développement d'approches basées sur la biologie moléculaire, dans lesquelles on teste directement des arrangements géniques de récepteur des cellules T (TCR ou TcR). Toutefois, il arrive souvent que plusieurs différents arrangements géniques du TCR (c'est-à-dire des combinaisons

de TCR β et de TCR α) reconnaissent la même spécificité (5). Souvent, on ne peut pas établir de corrélation entre une spécificité donnée et une expansion clonale d'un arrangement ou séquence TCR particulier. Ainsi, on ne peut pas établir
5 de corrélation entre la spécificité et un clone de lymphocytes T particulier.

L'analyse de la diversité du répertoire des lymphocytes T a utilisé essentiellement trois approches expérimentales différentes. La première implique
10 l'établissement de clones de lymphocytes T ou d'hybridomes de lymphocytes T (27, 28). Etant donné que les efficacités de clonage et de fusion peuvent varier d'un lymphocyte T à un autre, des biais importants peuvent être générés pendant le clonage utilisé dans cette méthode. A partir des segments
15 V et J du récepteur de cellules T, une seconde méthode utilise des anticorps monoclonaux (AcM) V β - et V α -spécifiques (29), permettant des analyses plus fiables des répertoires de lymphocytes T en l'absence d'une expansion in vitro. Toutefois, tous les réactifs V β ou V α ne sont pas
20 disponibles et le pouvoir de résolution de cette technique n'atteint pas le niveau clonal.

Ces dernières années, le travail réalisé par les présents inventeurs (4, 14) et d'autres (30, 32) a consisté à analyser la diversité du répertoire des lymphocytes T par
25 PCR, en utilisant des amorces V- ou J-spécifiques et, dans certains cas, le séquençage direct du TCR. Cette troisième approche comble les principales lacunes des techniques antérieures, étant donné qu'une amplification in vitro n'est pas exigée et que tous les différents segments V et J
30 peuvent être analysés, du moins théoriquement. Une information supplémentaire fournie par la détermination de la taille de la région CDR3 du TCR peut permettre l'expansion clonale directe.

Ces approches de la caractérisation de la diversité des lymphocytes T sont toutes centrées sur les caractéristiques structurelles du TCR. Les lymphocytes T répondent à des fragments peptidiques d'antigènes liés à la surface
5 cellulaire de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sur des cellules présentant des antigènes (APC). Cela signifie que le TCR se lie à un antigène peptidique en association avec des molécules du CMH, que l'on appellera ici complexe CMH/peptide. Il a été
10 difficile d'établir une corrélation entre l'utilisation de gène de TCR et la spécificité ainsi que la fonctionnalité du TCR pour une population de lymphocytes T particulière. Dans certains cas, on utilise de préférence un segment V ou longueur CDR3 particulier dans la réponse des lymphocytes T
15 à un complexe CMH/peptide donné (pour une revue, voir (33)). Le plus souvent, la réponse est apparemment diverse en terme d'utilisation de segments V et J ou de longueurs CDR3 pour les deux chaînes α et β . Jusqu'à présent, on a observé seulement quelques réponses ciblées de lymphocytes T chez
20 l'homme (4). Les méthodes destinées à obtenir des lymphocytes T spécifiques et à analyser la spécificité des lymphocytes T indépendamment des caractéristiques de structure du TCR ne devraient pas être soumises à ces limitations et d'autres, discutées dans les références
25 citées. Ainsi, il serait utile de disposer de telles méthodes.

Le tri cellulaire utilisant des anticorps a été largement utilisé pour obtenir et caractériser des propriétés phénotypiques et fonctionnelles de sous-ensembles
30 de cellules lymphoïdes (34). Le tri cellulaire à médiation par anticorps est basé sur la grande affinité de l'interaction anticorps/antigène. Etant donné la faible affinité du TCR pour son ligand (35), il peut être surprenant que la spécificité et l'efficacité du tri
35 cellulaire se manifestent avec des anticorps. L'affinité

intrinsèque du TCR pour son complexe CMH/peptide apparenté à été déterminée dans quelques cas et s'est avérée faible (inférieure à 10^{-5} et 10^{-7} M) (36, 37). Toutefois, Dal Porto et al. (38) ont décrit qu'une fusion bivalente H-2Kb/IgG présente une grande avidité (de l'ordre du nM) pour des lymphocytes T anti-Kb alloréactifs. La présente invention montre que l'on peut compenser la faible affinité du TCR pour son ligand apparenté en utilisant une densité élevée de complexes CMH/peptide, par exemple liés à un support solide.

10 L'analyse de la réponse des lymphocytes T à des tumeurs chez des animaux a montré que divers facteurs peuvent contribuer à l'inaptitude de l'animal à répondre avec succès aux antigènes spécifiques d'une tumeur et donc à la tumeur. Par exemple, une population insuffisante de lymphocytes T
15 spécifiques de la tumeur peut permettre aux cellules tumorales d'échapper aux effets cytotoxiques de la réponse des lymphocytes T (55).

De plus, des lymphocytes infiltrant les tumeurs ont été isolés à partir de patients et ont été utilisés pour
20 l'immunothérapie adoptive après culture in vitro (7-9). Les résultats obtenus ont été toutefois décevants. Le plus souvent, la raison en est que seulement un très faible pourcentage des lymphocytes infiltrant les tumeurs est réellement spécifique de la tumeur. De plus, des pertes
25 peuvent apparaître dans la population des lymphocytes T spécifiques à la tumeur pendant l'amplification in vitro ou une perte de l'activité tumorale de ces lymphocytes T peut apparaître en raison de mécanismes anergiques ou régulateurs.

30 Ces problèmes peuvent être résolus par une méthode dans laquelle la population de lymphocytes T spécifiques d'une tumeur chez un animal est isolée ou purifiée en se basant sur la liaison à un antigène spécifique d'une tumeur.

Toutefois, des méthodes antérieures de dilution limitée d'échantillons de lymphocytes T ne peuvent pas identifier des lymphocytes T ayant des capacités de liaison tumeur-antigène accrues ou justifient la perte de lymphocytes T pendant l'amplification. De plus, des limitations du tri cellulaire basé sur des anticorps ont été remarquées. Ainsi, il existe dans la technique une nécessité pour des méthodes nouvelles et améliorées, destinées à obtenir des cultures purifiées ou isolées de lymphocytes T spécifiques d'une tumeur. Les présents inventeurs ont comblé cette lacune par un aspect de l'invention divulguée. La présente description montre que des populations de lymphocytes T spécifiques peuvent être enrichies ou que des lymphocytes T spécifiques d'un antigène peuvent être purifiés selon leur spécificité en utilisant des complexes CMH/peptide couplés à un support solide.

Une autre approche destinée à obtenir ou purifier des populations de lymphocytes T spécifiques implique l'induction ou la stimulation de lymphocytes T. Les lymphocytes T répondent à des fragments peptidiques d'antigènes liés à la surface cellulaire de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sur des cellules présentant des antigènes (APC). La liaison du TCR à des complexes CMH/peptide est favorisée par les co-récepteurs CD4 ou CD8 et conduit à la prolifération et la différenciation des lymphocytes T.

Toutefois, l'excitation médiée par TCR est généralement inefficace, sauf si elle est accompagnée par des signaux "co-stimulateurs". Ces signaux régulent la production de lymphocytes T par des cytokines stimulant la croissance, tels que IL-2, et résultent de l'interaction d'ensembles multiples de molécules complémentaires sur des lymphocytes T et des APC, par exemple entre CD28 sur des lymphocytes T et B7 sur des APC. Un grand nombre de diverses molécules sur

les APC, comprenant par exemple B7.1, B7.2-ICAM et HSA, sont connues pour exprimer une fonction co-stimulatrice dans des conditions in vitro définies. Les molécules les plus importantes pour la co-stimulation ne sont pas encore
5 élucidées.

Un protocole permettant de connaître les facteurs les plus importants de la co-stimulation utilise des cellules transfectrices avec des gènes de molécules co-simulatrices connues et ensuite, teste la fonction d'APC de ces cellules.
10 Un inconvénient de cette approche est que pratiquement tous les types cellulaires expriment au moins un faible taux de certaines molécules co-stimulatrices. Cette expression d'arrière-plan pose moins de problème si l'on utilise une APC artificielle pour la présentation. Par conséquent, il
15 serait intéressant dans la technique de disposer de méthodes pour stimuler ou induire une réponse de lymphocytes T qui serait dépourvue de signaux co-stimulateurs, c'est-à-dire une APC artificielle.

RESUME DE L'INVENTION

20 L'invention comprend diverses utilisations de complexes CMH/peptide. Un complexe CMH/peptide désigne une molécule du CMH chargée d'antigènes spécifiques. Les complexes CMH/antigène peuvent être utilisés pour obtenir, isoler ou purifier des populations de lymphocytes T spécifiques
25 lorsqu'elles sont liées à, ou lorsqu'elles adhèrent à, un support solide. Des antigènes ou déterminants modifiés du CMH des classes I et II, sont capables d'imiter fonctionnellement les produits géniques naturels. Ainsi, des déterminants modifiés du CMH, tels que ceux décrits et
30 présentés par des exemples spécifiques, peuvent être utilisés aussi bien que les molécules codées par le CMH, naturelles ou identifiées antérieurement.

Des complexes CMH/antigène peuvent être également utilisés pour stimuler les lymphocytes T. Pour activer les lymphocytes T, on peut utiliser des billes enrobées comprenant le complexe CMH/antigène spécifique. Il est également possible de provoquer chez les lymphocytes T la formation de lymphocytes T cytotoxiques qui sont dirigés contre l'antigène spécifique.

La méthode générale qui constitue un aspect de la présente invention permet la purification réussie de lymphocytes T spécifiques d'un antigène ou d'un peptide pour tout antigène, y compris les antigènes associés à une tumeur. La méthode consiste à utiliser un substrat solide et à coupler un déterminant du CMH chargé d'un peptide ou antigène au substrat solide.

Dans un mode de réalisation, la méthode utilise des billes magnétiques couplées à une haute densité de molécules du CMH qui sont chargées d'un peptide.

Cette méthode permet de purifier, isoler et quantifier des lymphocytes T spécifiques d'une tumeur à partir d'échantillons contenant des lymphocytes T, par exemple des lymphocytes infiltrant une tumeur (TIL) et des échantillons d'exsudat péritonéal (PE). De telles populations de lymphocytes T purifiés peuvent être encore multipliées in vitro et présentent une activité cytotoxique plus élevée et une action anti-tumorale accrue après réinjection à des animaux porteurs d'une tumeur. La nouvelle approche divulguée et revendiquée ici fournit des méthodes importantes pour analyser le répertoire de lymphocytes T au niveau de la spécificité peptidique et pour améliorer de nouveaux traitements thérapeutiques basés sur l'immunothérapie de lymphocytes T adoptifs.

Dans un cas, on a découvert avec surprise que les lymphocytes T, purifiés à partir d'un support solide

comprenant le CMH chargé d'un antigène spécifique d'une tumeur, présentent une activité antitumorale renforcée. La présente invention est utile pour tous les types de tumeurs, c'est-à-dire qu'elle s'est avérée efficace non seulement
5 dans le traitement de tumeurs solides, mais aussi dans le traitement de la leucémie, de lymphomes, etc. Toutefois, les méthodes liées à des lymphocytes T spécifiques d'une tumeur ne constituent qu'un mode de réalisation de la présente invention. D'une manière analogue par exemple, des antigènes
10 spécifiques d'un virus peuvent être utilisés dans des méthodes destinées à purifier des lymphocytes T qui sont spécifiques de cellules infectées par un virus. Ainsi, l'homme du métier peut utiliser l'invention décrite avec un antigène quelconque capable de produire, ou connu pour
15 produire, une réponse dans des lymphocytes T afin d'obtenir des lymphocytes T spécifiques d'un antigène ayant une spécificité voulue.

Dans un autre mode de réalisation, la présente invention fournit un outil de diagnostic puissant pour la détection de
20 lymphocytes T présentant un TcR spécifique. Par exemple, les lymphocytes T peuvent être utilisés pour détecter la présence de lymphocytes T qui répondent aux cellules tumorales chez des patients, dans des échantillons ou chez des animaux.

25 Dans d'autres modes de réalisations, l'invention fournit des méthodes, des troussees et des procédés pour analyser et pour utiliser des CTL humains dirigés contre un peptide spécifique. L'identification de peptides dérivés de cellules tumorales permet par exemple de provoquer des réponses de
30 CTL antitumoraux et fournit des réactifs importants pour structurer des immunothérapies antigène-spécifiques et stimuler la recherche et développement futurs d'immunothérapies. Des stratégies d'identification de ces peptides thérapeutiques sont basées sur la sélection de

liants du CMH, ayant une affinité élevée, à partir d'antigènes associés à une tumeur. Divers tests de liaison utilisant des systèmes cellulaires (93, 94) ou basés sur des tests en phase solide (95, 101) peuvent être utilisés.

5 D'autres systèmes de test sans cellules, basés sur l'aptitude de peptides concernés à stabiliser des molécules du CMH de classe I vides (102-105) ou à assembler les CMH de classe I à partir de ces sous-ensembles (106) ont été décrits, mais généralement, ils sont complexes du point de

10 vue technique et grévés par le manque de reproductibilité. Une fois définie, l'aptitude des peptides potentiellement immunogènes à induire des CTL capables de tuer sélectivement des cellules tumorales humaines doit être testée. Le progrès accompli dans ce domaine est faible en raison des problèmes

15 pratiques limitant l'utilisation de l'immunisation in vivo et l'absence de reproductibilité des méthodes d'amorçage in vitro.

L'invention décrit la production réussie d'une molécule sSC-A2 biologiquement active. Cette molécule sSC-A2 est

20 repliée convenablement (figure 17) et se lie spécifiquement à des peptides antigéniques restreints par A2 et ne se lie pas à des peptides murins restreints H-2.K^b ou H-2.K^d (figure 18). De plus, les complexes sSC-A2/peptide entrent en interaction avec le récepteur de cellules T approprié et

25 provoquent une réponse proliférative de CTL spécifiques d'un peptide (figure 19). De plus, l'invention montre que les complexes sSC-A2/peptide, lorsqu'ils sont appliqués sous forme d'enrobage de haute densité sur des billes, peuvent être utilisés en tant qu'APC artificielles pour provoquer

30 l'amorçage in vitro de sites spécifiques d'un peptide de cellules naïves PBL HLA A2.1 de donneurs sains.

En possession de l'enseignement combiné issu de la définition des exigences strictes de taille pour les interactions CMH de classe I-peptide, et les motifs de

liaison spécifiques du CMH, cette molécule sSC-A2 permet de développer un test de liaison CMH-peptide sensible et fiable. Un tel test serait utile pour identifier des épitopes de lymphocytes T ayant une affinité élevée à partir d'antigènes connus associés à une tumeur, qui peuvent être potentiellement immunogènes pour les CTL. On a décrit récemment divers protocoles pour l'induction par des peptides in vitro de réponses de CTL primaires chez la souris (107-100) et dans des systèmes humains (111-112). Ils indiquent que la condition préalable pour l'amorçage des CTL est la capacité des APC à présenter une densité élevée de complexes peptide-molécules du CMH. Les signaux co-stimulateurs exigés pour l'activation des lymphocytes T, B7.1 ou B7.2 intégrant avec CD28/CTLA-4 sur des lymphocytes T (113-116), peuvent être également impliqués, bien qu'une publication récente indique que l'interaction B7-CD28 ne soit pas essentielle pour l'amorçage des CTL (86). Les résultats obtenus dans le système murin indiquent que les complexes sSCK^d-peptide, lorsqu'ils sont appliqués avec une haute densité comme revêtement de billes magnétiques, peuvent être utilisés pour purifier et quantifier des lymphocytes T spécifiques d'un peptide, issus d'un lymphocyte d'exsudat péritonéal (PEL) isolé, malgré une interaction d'affinité assez faible entre leur TCR apparenté et les molécules peptide/CMH. Ce phénomène sous-tend la relation importante entre l'avidité et l'affinité d'interaction apparente, qui est en bonne corrélation avec le fait que des molécules peptide/CMH dimères se lient au TCR avec une plus grande affinité que les molécules peptide/CMH monomères (117).

On montre ici également que les complexes sSC-A2/peptide, lorsqu'ils sont appliqués avec une densité élevée sur des billes, peuvent être utilisés en tant qu'APC artificielles pour provoquer l'amorçage in vitro de CTL spécifiques d'un peptide à partir de cellules PBL HLA A2.1

naïves de donneurs sains. Ainsi, un important aspect de la présente invention est la génération et l'utilisation d'APC artificielles. La réponse spécifique présentée peut être la conséquence d'une interaction directe entre les complexes
5 sSC-A2/peptide et le récepteur de CTL approprié (figures 19 et 21).

Il est important de noter que, bien qu'il ait été décrit que la majorité des CTL spécifiques d'un peptide, générés par des techniques de simulation de peptides in vitro, n'a
10 pas été capable à ce jour de lyser les cibles exprimant des épitopes traités naturellement (107, 111), en utilisant la présente invention, des CTL induits avec les billes peptide M58-66/SC-A2 se sont révélés efficaces pour tuer des lymphocytes T2 activés par peptide (figure 20b). Les CTL
15 spécifiques multipliés utilisent d'une manière prédominante le TCR VB17 avec la région CDR3 ayant une longueur de 8 acides aminés, comme décrit pour les CTL spécifiques de M58-66, issus d'une infection virale in vivo (figure 21). Ces résultats indiquent que les CTL spécifiques amorcés par
20 le protocole in vitro décrit tuent les cellules cibles infectées aussi bien que les lymphocytes T2 activés par peptide.

On pourrait objecter que la multiplication in vitro de CTL M58-66-spécifiques n'est pas la conséquence de
25 l'induction primaire, mais probablement une réactivation in vitro, étant donné qu'un précurseur de CTL M58-66 de fréquence relativement élevée a été décrit pour des cellules PBL de donneurs sains (90). Une explication possible est que l'exposition à une attaque virale préalable de la plupart
30 des sujets sains et l'exigence d'une sensibilisation initiale ou d'une réactivation des cellules de mémoire sont des choses très différentes. Toutefois, en utilisant le même protocole et la même méthode dans le laboratoire des présents inventeurs, on a obtenu une multiplication de CTL

spécifiques des peptides NA17-A (Y. Guilloux, communication personnelle), une multiplication de CTL MAGE-3- et Melan-A-spécifiques (P. Bosso, communication personnelle); une multiplication de CTL spécifiques des peptides MAGE-3 et polyspécifiques des peptides VIH, de plus, les CTL qui ont été amorcés avec les billes peptide MAGE-3/SC-A2 ou peptide Pol VIH/SC-A2 se sont avérés efficaces pour tuer les lymphocytes T2 activés par peptide aussi bien que les cellules tumorales MAGE-3 positives ou les cellules de Jurkat transfectées par Pol VIH.

En utilisant dans le système murin la molécule sSC-Kd murine analogue, on obtient une amplification de CTL spécifique du peptide HLA CW3, spécifique du peptide NP (I. Motta, communication personnelle). Pris ensemble, ces résultats suggèrent que la condition d'induction in vitro est correcte. Ainsi, la différence observée par rapport à l'induction in vitro classique par peptide peut résider dans la différence entre la densité des complexes peptide/sSC-A2 sur des billes et celle des complexes peptide/CMH sur des cellules APC naturelles et/ou en l'absence de molécules co-stimulatrices sur les billes. Ces dernières sont fortement représentées sur des APC telles que des cellules dendritiques, toutefois, il est décrit que des molécules co-stimulatrices telles que les B7.1 ou B7.2 ne sont pas absolument nécessaires pour l'induction initiale (86). Dans le système des présents inventeurs, l'absence d'activité de molécules co-stimulatrices peut être compensée partiellement par la présence de cytokines exogènes dans le milieu de culture. Une référence récente décrit de façon intéressante que des cellules tueuses naturelles (natural killer, NK) sont nécessaires dans l'induction de lymphocytes T cytotoxiques (118-119). On a montré que sSC-Kd dimère peut inhiber d'une manière spécifique l'activité de NK de cellules NK (de souris DBA/2 H-2K^d) (120). Il est possible que des billes APC artificielles enrobées de complexes

peptide-sSC-A2 puissent activer de telles cellules NK, car d'autres molécules HLA de classe I sont absentes sur les billes. L'absence de molécules du CMH elles-mêmes sur des cellules APC peut activer des cellules NK (121, 122). Des
5 cellules NK activées produisent de grandes quantités d'IL-4, d'interféron γ (IFN- γ), d'IL-5 et d'IL-10 (voir référence (123)), elles produisent aussi de nombreux autres chemokines, tels que MIP-1a, MIP-1b, la lymphotactine et TCA-3. La présence de ces cytokines et de diverses
10 chemokines dans le milieu peut avoir une certaine influence positive sur l'induction d'une réponse immunitaire. Cette activité plausible de billes d'APC artificielles est actuellement à l'étude. Ainsi, en fonction de la méthode d'induction in vitro utilisée, différentes sous-populations
15 de CTL peuvent être générées spécifiquement pour le même épitope peptidique. Que ces sous-populations de CTL diffèrent en terme d'affinité de TCR ou d'avidité de TCR présente de l'intérêt. Les mécanismes qui soutendent l'induction initiale des CTL, ayant comme résultat
20 l'émergence de CTL spécifiques de peptides, avec différentes aptitudes à lyser des cellules cibles activées par peptide et/ou des cellules tumorales, peuvent être équivalents à ceux opérant dans le thymus pendant l'éducation des thymocytes. Toutefois, dans le thymus, des processus de
25 sélection positives et négatives forment le répertoire des lymphocytes T périphériques. La sélection positive est médiée par les cellules épithéliales du thymus cortical (124, 125), tandis que les cellules dendritiques et les macrophages sont supposés être les principaux types
30 cellulaires impliqués dans la sélection négative du thymus (126). Il faut également mentionner les modèles de P. Kourilsky (127) et de P.G. Ashton-Rickardt et S. Tonegawa (128, 129) qui éclairent la notion d'avidité globale d'interaction pendant les processus de sélection positive et
35 négative. Cette avidité d'interaction dépend de plusieurs

paramètres comprenant : i) la densité des complexes peptide/CMH sur les cellules de sélection ; ii) l'affinité des TCR sur le thymocyte envers les complexes peptide/CMH positifs (ou négatifs) ; iii) la densité des TCR sur le
5 thymocyte ; iv) la densité de molécules d'adhérence, de co-récepteurs (CD4, CD8), de molécules co-stimulatrices (B7.1, B7.2, CD28/CTLA-4) sur la sélection positive (ou négative) et les cellules sélectionnées. Une étude supplémentaire est nécessaire pour clarifier le mécanisme d'activation de CTL
10 primaires spécifiques.

La présente invention représente la première divulgation et constitue le premier exemple d'une induction in vitro de CTL primaires dans le système humain, utilisant un complexe synthétique peptide/sSC-A2, résultant en cellules
15 effectrices qui tuent les cellules exprimant un antigène spécifique, c'est-à-dire les cellules tumorales. En plus de l'exemple d'induction des CTL présentés ici, les CTL de spécificité et de réactivité tumorale similaires sont générés dans le système murin en utilisant également des
20 billes de complexes peptide/sSC-K^d issus de cellules naïves H-2K^d de la rate (I.Motta et YC Lone, étude non publiée).

Il existe de nombreux avantages à utiliser l'invention comprenant le peptide sSC-A2 synthétique en tant que cellule artificielle APC pour générer des CTL spécifiques à partir
25 de donneurs sains. Tout d'abord, le système est d'une définition et d'une reproductibilité élevées. Deuxièmement, par définition, il est dépourvu d'organismes pathogènes viables et n'exige pas des conditions de manipulation spéciales. Plus important encore, les CTL ayant la
30 spécificité voulue peuvent être sélectionnés pour la multiplication et l'utilisation clinique potentielle, comme c'est évident pour l'homme du métier.

La recherche et développement actuel des thérapies par lymphocytes T du cancer humain est entravée pour une grande partie par l'absence d'antigènes tumoraux identifiabiles (69, 70). Les récents progrès effectués dans la compréhension de l'interaction entre des peptides naturels et des molécules du CMH permettent l'identification de peptides immunogènes similaires dans une séquence de protéines basée sur la présence de résidus spécifiques conservés ("ancres") (71). Les peptides liants les CMH de classe I, qui présentent généralement une longueur de 9-10 résidus, contiennent généralement dans leur séquence deux résidus d'ancrage qui entrent en interaction avec des poches de liaison correspondantes dans la molécule de CMH (72, 74). La définition de motifs spécifiques du CMH permet de prévoir les peptides dérivés d'antigènes d'origine virale ou tumorale qui sont potentiellement immunogènes pour les CTL. Ces peptides se lient généralement avec une bonne affinité à la molécule du CMH considérée (75).

On a produit des molécules recombinantes monocaténaires HLA-A2.1 qui peuvent être utilisées dans la recherche et développement concernant le traitement de cancers humains. La disponibilité de ces molécules permet le développement d'un test rapide et sensible pour l'identification d'épitopes de lymphocytes T présentant un intérêt potentiel. On a construit la structure sSC-A2 en connectant les trois premiers domaines de la chaîne lourde A2.1 à la β 2-microglobuline humaine par l'intermédiaire d'un espaceur ayant la longueur de 15 acides aminés. Par transfection dans des cellules basophiles de rats (RBL), la molécule sSC-A2 est sécrétée dans le milieu de culture à partir duquel il peut être purifié. La molécule est repliée correctement et se lie spécifiquement à des peptides antigéniques restreints par A2, mais ne se lie pas à des peptides murins restreints par H-2K^b ou H-2K^d. De plus, les complexes sSC-A2/peptide induisent spécifiquement une réponse proliférative de CTL

apparentés et les billes enrobées avec une densité élevée de complexes sSC-A2/peptide sont des APC artificielles efficaces et élicitent in vitro les CTL peptide-spécifiques à partir de PBL HLA-A2.1 naïves de donneurs sains. L'utilité
5 potentielle de ces molécules sSC-A2 est discutée.

La molécule du CMH

L'expression "complexe majeur d'histocompatibilité", en abrégé "CMH", est connue dans la technique. L'expression est utilisée dans la présente description dans un sens
10 générique, pour désigner l'ensemble de produits géniques comprenant les marqueurs d'histocompatibilité pour un animal. Les complexes CMH/peptide de la présente invention peuvent être obtenus à partir de gènes ou de molécules du CMH naturels ou isolés préalablement ou caractérisés. De
15 plus, on peut utiliser des "déterminants modifiés du CMH" comme partie ou totalité de la molécule du CMH. Les déterminants CMH modifiés imitent fonctionnellement les produits géniques naturels.

Produits géniques du complexe majeur
20 d'histocompatibilité de classe I et classe II. Les produits géniques du CMH de classe I sont des glycoprotéines qui sont liées de façon non covalente à un peptide appelé β_2 -microglobuline, en abrégé " β_2 -m" ou " β_2 -M". Le composant de classe I est désigné comme la chaîne lourde et la β_2 -
25 microglobuline, comme la chaîne légère. L'orientation de la molécule du CMH de classe I de la β_2 -microglobuline dans une membrane cellulaire est illustrée à la figure 1.

En se référant à la figure, la structure de la chaîne lourde est organisée avec 3 domaines exposés, α_1 , α_2 et α_3 ,
30 qui s'étendent depuis la surface cellulaire et sont fixés à un domaine transmembranaire hydrophobe 1 et à un segment court d'ancrage cytoplasmique 2 à l'intérieur de la cellule. Deux domaines extérieurs (α_2 et α_3) présentent des liaisons

disulfure intracaténaïres (formant des boucles avec une homologie considérable avec Ig).

La chaîne légère (β_2 -microglobuline) représentée à la figure 1 présente à peu près la même taille que les domaines α de la chaîne lourde. Chaque domaine est similaire à l'immunoglobuline, et est constitué par un feuillet plissé plié β , maintenu ensemble par une liaison disulfure aux extrémités, donnant une surface de type plan. La chaîne β_2 est repliée sur le domaine α_3 de la chaîne lourde et les domaines α_1 et α_2 sont également appariés.

Le gène β_2 -microglobuline est situé sur un chromosome différent de celui contenant le produit génique du CMH de classe I. Sa structure est bien conservée, tandis que celle des chaînes lourdes varie fortement d'un individu à l'autre en raison des différences dans les séquences d'acides aminés des domaines extérieurs. Le polymorphisme de la chaîne lourde est dû principalement au domaine α_1 et à un moindre degré au domaine α_2 .

Les produits des gènes de classe II sont bien caractérisés. Chez la souris, le produit génique de classe II (IA) est constitué par deux chaînes polypeptidiques (α et β , figure 2). Les chaînes α et β sont divisées en deux domaines extérieurs (α_1 et α_2 ou β_1 et β_2), les domaines transmembranaires 3 et 4 de la figure 2 et les domaines cytoplasmiques 5 et 6. Les résidus cystéine qui participent à la formation des ponts disulfure sont désignés par S à la figure 2.

Les produits géniques du CMH de classe I et de classe II peuvent être glycosylés. Toutefois, ils peuvent ne pas être nécessairement glycosylés lorsqu'ils sont utilisés dans la présente invention.

Déterminants modifiés du CMH de classe I et de classe II. Les descriptions des demandes U.S. en cours d'examen, n° de série 08/487650, déposée le 7 juin 1995 et 08/370476 déposée le 9 janvier 1995, fournissent les méthodes pour la production et l'utilisation de déterminants modifiés du CMH ainsi qu'une discussion générale sur les CMH et les gènes du CMH chez les mammifères. De même, la demande de brevet U.S. en cours d'examen, n° de série 07/801818, déposée le 5 décembre 1991, décrit le déterminant modifié du CMH et des molécules et gènes du CMH. Le contenu total de ces demandes en cours d'examen est incorporé ici spécifiquement à titre de référence. L'homme du métier peut utiliser la publication des demandes en cours d'examen pour produire une variété de complexes CMH/peptide. Les informations correspondantes sont également données dans (20), (21), (24), (76), (78) à (80), en particulier dans (76).

Toute référence dans ce qui suit aux demandes US ci-dessus équivaut de manière implicite à une référence à au moins l'un de ces documents.

Un déterminant modifié du CMH de classe I est représenté schématiquement à la figure 3A. Le domaine α_3 de la chaîne lourde est lié au domaine de microglobuline au moyen d'un espaceur (représenté en pointillé à la figure 3A). Le produit résultant, qui est représenté en forme de schéma-bloc à la figure 3B, est le déterminant modifié du CMH de classe I et comprend les domaines de α_1 , α_2 , α_3 et β_2 -microglobuline liés par covalence, en séquence. Comme représenté à la figure 3A, le domaine α_3 de la chaîne lourde est dépourvu de la région la plus proche de la région 1 du domaine transmembranaire de la figure 1 jusqu'à la terminaison carboxyle du segment cytoplasmique 2.

Les déterminants modifiés du CMH de classe I peuvent être préparés par une sélection appropriée du locus CMH codant pour les domaines α_1 , α_2 , α_3 , et un gène codant pour le domaine β_2 -microglobuline, de sorte que chacun de ces
5 domaines va conserver sa fonction soit d'activation des lymphocytes T cytotoxiques, soit de présentation d'antigènes à des récepteurs de cellules T, soit ces deux fonctions à la fois. Que la molécule particulière possède ou non l'une de ces fonctions, ou les deux, peut être déterminé par une
10 expérimentation de routine connue dans la technique. L'expression du polypeptide codé par le locus CMH peut être réalisée par des techniques d'ADN recombinant.

Un déterminant du CMH de classe II modifié selon l'invention est représenté schématiquement à la figure 4A. A
15 la figure 4A, la terminaison amino du domaine α_1 est liée à la terminaison carboxyle du domaine β_1 , par exemple au moyen d'un espaceur (en pointillé). De même, la terminaison carboxyle du domaine α_2 est liée à la terminaison amino du domaine β_2 , par exemple au moyen d'un autre espaceur (en
20 pointillé). Le produit résultant est le déterminant modifié CMH de classe II selon la présente invention, qui peut être représenté par le schéma-bloc représenté à la figure 4B. Le déterminant modifié comprend les domaines β_2 , α_2 , α_1 et β_1 liés par covalence, en séquence. Comme représenté à la
25 figure 4A, le déterminant modifié est dépourvu des régions voisines des domaines transmembranaires 3 et 4 de la figure 2 s'étendant jusqu'à la terminaison carboxyle des segments cytoplasmiques 5 et 6 qui sont normalement fixés à la chaîne α_1 , α_2 et à la chaîne β_1 , β_2 , respectivement. Une
30 fois encore, les portions des locus du CMH sont sélectionnées pour conserver la fonction des domaines dans la stimulation d'une réponse cytotoxique ou dans la présentation d'antigènes aux récepteurs de cellules T, ou les deux.

L'un quelconque des polypeptides appropriés d'un complexe majeur d'histocompatibilité peut être choisi et utilisé pour générer des complexes CMH/peptide de la présente invention. Les locus génétiques appropriés
5 correspondant à une molécule du CMH peuvent être également utilisés dans des moyens recombinants pour produire le CMH dans les complexes CMH/peptide de la présente invention. L'homme du métier est familier avec de nombreux exemples d'allèles de CMH de diverses espèces, dont chacun peut être
10 sélectionné de manière appropriée et utilisé comme décrit.

Jonction des domaines polypeptidiques du déterminant modifié du CMH. Les domaines des déterminants modifiés du CMH correspondent à des domaines codés par les locus naturels du CMH et leurs variantes, qui codent pour des
15 produits du CMH capables de produire une réponse cytotoxique par des lymphocytes T appropriés ou d'induire une réponse immunitaire par des lymphocytes. Les déterminants modifiés du CMH de classe I et de classe II utilisés diffèrent des produits géniques naturels du CMH de mammifères par le fait
20 que les domaines des produits géniques sont liés par covalence, par exemple au moyen d'un espaceur. De même, le déterminant modifié du CMH de classe II de la présente invention est constitué par une chaîne polypeptidique dans laquelle les domaines β_2 - α_2 - α_1 - β_1 sont liés par covalence.
25 Ces domaines ne sont jamais liés de cette façon dans la nature. Les déterminants modifiés du CMH de classes I et II sont identiques par ailleurs aux produits géniques naturels correspondants du CMH.

Les déterminants modifiés du CMH peuvent être obtenus à
30 partir de structures d'ADN codant pour les domaines du CMH, de façon qu'il existe une traduction transcriptionnelle. Par exemple, dans le cas de déterminants du CMH de classe I, la structure d'ADN contient une séquence d'ADN codant pour les domaines α_1 , α_2 et α_3 liés à une séquence d'ADN codant pour

le domaine β_m , de sorte qu'il existe une traduction transcriptionnelle à partir de l'extrémité 5' de l'ADN codant pour le domaine α_3 jusqu'à l'extrémité 3' de la séquence d'ADN codant pour le domaine β_m . De même, les déterminants modifiés du CMH de classe II selon l'invention peuvent être obtenus à partir de constructions d'ADN dans lesquelles il existe une traduction transcriptionnelle d'une séquence d'ADN codant pour les domaines β_2 - α_2 - α_1 - β_1 .

Les domaines du CMH peuvent être liés par covalence par des espaceurs appropriés. Les espaceurs peuvent fonctionner en tant que charnières pour le déterminant modifié. Toute séquence d'acides aminés contenant les résidus appropriés et ayant la longueur convenable qui correspond à ce qui est connu dans la technique en tant que charnière ou région charnière peut être utilisée. Les demandes U.S. en cours d'examen n° de série 07/801818, 08/487650 et 08/370476 décrivent des espaceurs particuliers et des séquences nucléotidiques et d'acides aminés qui peuvent être utilisés. De plus, le peptide qui doit être associé à la molécule du CMH peut être éventuellement lié à la région de l'espaceur.

L'antigène peptidique

L'antigène ou peptide qui doit être chargé sur une molécule du CMH de classe I appropriée, ou sur un déterminant modifié du CMH, contient typiquement d'environ 5 à environ 20 résidus d'acides aminés, de préférence 8, 9 ou 10 résidus d'acides aminés. On peut utiliser des peptides plus longs avec les déterminants modifiés du CMH de classe II.

Les peptides naturels qui se lient à des produits géniques du CMH peuvent être modifiés en une ou plusieurs positions par substitution d'autres acides aminés ou par délétion d'acides aminés. De cette façon, l'homme du métier peut produire de nombreux antigènes peptidiques pouvant être

utilisés avec la présente invention à partir d'un peptide qui se lie à des produits géniques du CMH.

Le peptide modifié ne va pas nécessairement présenter les mêmes caractéristiques de liaison que le peptide naturel ou non modifié. Toutefois, l'homme du métier peut observer et identifier des motifs peptidiques spécifiques d'un allèle, capables d'être présentés par des déterminants appropriés du CMH. Ces motifs peptidiques contiennent typiquement deux positions d'ancrage occupées par un résidu d'acide aminé invariant ou par l'un parmi quelques résidus d'acide aminé conservés, avec des chaînes latérales étroitement apparentées. Les positions d'ancrage ne sont pas toujours au même emplacement dans les différents motifs. La structure du peptide modifié peut correspondre à des caractéristiques du sillon lié au peptide du déterminant modifié du CMH. Ainsi, les poches allèle-spécifiques des déterminants modifiés du CMH de la présente invention et les chaînes latérales des résidus d'ancrage allèle-spécifiques peuvent présenter de préférence des structures complémentaires.

En particulier, les antigènes spécifiques d'une tumeur qui peuvent être utilisés dans la présente invention sont typiquement les antigènes qui sont exprimés uniquement sur des cellules tumorales et non sur des cellules normales. L'homme du métier connaît bien de nombreux antigènes spécifiques d'une tumeur qui peuvent être utilisés pour générer les peptides de la présente invention. Par exemple, des antigènes tumoraux restreints par le CMH de classe I comprennent : P1A (testicules), Connexin 37 (poumons), MAGE-1 (mélanocytes), MAGE-3 (mélanocytes), MART1/Aa (mélanocytes), gp100 (mélanocytes), p53 (sein et colon) et tyrosinase (mélanocytes). De nombreux autres exemples existent et peuvent être utilisés pour générer les peptides qui sont utilisables selon la présente invention. Voir (55),

(57) et (58) pour des listes représentatives d'antigènes, de protéines ou de peptides. De plus, les demandes en cours d'examen n° de série 08/370476 et 08/487650 contiennent des listes d'antigènes apparentés à des cellules infectées par
 5 VIH, par la grippe et d'autres peptides, qui peuvent être utilisés selon la présente invention.

Les peptides préférés pour l'aspect lymphocyte T spécifique d'une tumeur de la présente invention comprennent, sans y être limités, les exemples suivants :

Séquence	Peptide
YIPSAEKI	PbCS
SYIPSAEYI	PbCS-LIKE
RYLKNGKETL	CW3
KYQAVTTTLEE	P198
TYQRTRALV	NP147
ASNENMETM	NP366
RGYVYQGL	VSV52
SIINFEKL	Ova8
LPYLGWLVF	PIA

Ces peptides sont connus dans la technique et peuvent
 25 être fournis par Neosystem (Strasbourg, France). Des

librairies peptidiques peuvent être fournies par Hidde Ploegh (MIT).

Quelques directives pour sélectionner des combinaisons peptide/CMH. Généralement, l'homme du métier peut sélectionner des combinaisons appropriées de domaines du CMH pour les utiliser dans la génération de complexes CMH/peptide selon la présente invention. La connaissance de l'antigène peptidique voulu et de ses caractéristiques de réponse immunitaire chez un animal particulier peuvent être suffisantes en plus d'une expérimentation de routine. La présente description et celle des demandes U.S. en cours d'examen mentionnées ci-dessus fournissent de nombreux exemples de peptides ayant des éléments de restriction appropriés pour sélectionner des domaines du CMH. En plus des combinaisons énumérées, l'homme du métier peut utiliser la présente invention avec l'information concernant tout autre peptide et élément de restriction qui peut être indépendamment identifié ou devenir disponible. De plus, l'homme du métier peut déduire, à partir de la structure d'antigènes peptidiques connus, les domaines appropriés du CMH à utiliser avec un peptide particulier. La présente description et les références citées comprennent à la fois l'information concernant des antigènes peptidiques connus et la déduction des combinaisons CMH-peptide à sélectionner.

On peut également utiliser l'information suivante : (a) Un peptide reconnu par des lymphocytes T humains peut se lier à plusieurs molécules HLA des classes I et II. Néanmoins, la liaison préférentielle de peptides à leurs molécules de restriction respectives est également observée. (b) La liaison de molécules HLA à des peptides reconnus par des lymphocytes T murins se produit moins fréquemment, mais se produit et de tels mécanismes sont prévus par la présente invention. (c) Il existe des peptides VIH-1 contenant des résidus agrétopiques qui permettent leur liaison à des

molécules HLA et qui sont particulièrement intéressants dans le domaine de l'invention. (d) La cinétique de l'association HLA/peptide dépend du peptide testé et elle est plus rapide que, ou similaire à, celle pour des molécules Ia. (e) La
5 liaison de la molécule peptide/HLA dépend souvent de la longueur, du nombre de charges positives et de la présence de résidus hydrophobes dans le peptide. (f) Une corrélation peut être observée entre l'effet inhibiteur du peptide dans l'inhibition du test de la liaison peptidique (IPBA) et son
10 effet de blocage dans le test cytolytique.

D'autres exemples de peptides typiques qui peuvent être combinés à des déterminants modifiés du CMH utilisés dans la présente invention sont indiqués ci-après.

Peptides de liaison à des déterminants CMH modifiés

5	Peptide	Séquence	Elément de restriction
	<i>Virus de l'influenza</i>		
	Matrice		
	M. 57-68	KGILGFVFTLV	
	M.Y. 57-68	YKGILGFVFTLV	HLA-A2
	NUCLÉOPROTEÏNE		HLA-A2
	N. 147-158R	TYQTRALVTG H-2 K ^b	
	N. 335-349Y	SAAFEDLRVLSFIRGY	HLA-B37
	Hémagglutinine		
	H. 130-142	HNTNGVTAACSHE	Ia ^d
	H. 305-329	CPXYVKQNTLKLATGMENVPEKQTR	HLA-DR
	Lysozyme Lys. 46-61	NTDGSTDYGILOINSR	Ia ^a
	Répresseur λ AR. 12-26	LEDARRLKAIYEKKK	Ia ^c
	HLA-A2: A2. 170-185	RYLENGKETLQRTDAP	H-2 K ^d
	HIV 1		
	GAG. 51-65	LETSEGCRCQILGQLQ	
	205-219	ETINEEAAEWDRVHP	-
	219-233	HAGPIAPGQMREPRG	-
	265-279	KRWIILGLNKIVPMY	HLA-B27
	378-391	MQRGNFRNQKHIVK	-
	418-433	KEGHQMKDCTERQANF	HLA-A2
	Env. 105-117	HEDIISLWDQSLK	Ia ^a
	312-327	IRIQRGPGRAFVTIGK	H-2 D ^a
	428-445	FINMWQEVGKAMYAPPIS	Ia ^a
	474-489	RPGGGDMRDNRSELY	-
	510-521	VVQREKRAVGIG	-
	584-604	RILAVERYLKDQQLLGIWGCS	HLA, C1 II ^a
	627-643	YVAEGTDRVIEVVGACR	-
	646-660	RHIFRRIRQGLERIL	-

Peptide		Séquence	Elément de restriction
5	Nef.	66-80	VGFPVTPQVFLRPMT
		79-94	MTYKAAVDLSHFLKEK
		113-129	WIYHTQGYFFDWQNYT
		132-147	GVRYPPLTFGWICYLVP
		137-148	LTFGWCYKL
		160-174	ENTSLLHPVSLHGMD
	Vif.	1-15	MENRWQVMIVWQVDR
		25-40	VKHEMYVSGKARGWFY
		46-60	SPHPRISSEVHIPLG
		60-72	GDARLVITTYWGL
10	Ref.	71-85	GLHTGERDWHLGQGV
		1-16	MAGRSGDSDEDLLKAV
		19-30	LKFLYQSNPPPN
		37-50	ARRNRRRRWRRERQR
	Vpr.	1-14	MEQAPEDQGPPQREP
		55-68	AGVAETIRILQQLL
		68-80	LFTHFRIGCRHSR
			-

15 * Elément de restriction non défini avec précision.

Des exemples d'autres épitopes peptidiques qui peuvent être combinés à des déterminants modifiés du CMH utilisés dans la présente invention sont indiqués ci-après.

Peptides de liaison à des déterminants modifiés du CMH

5

Séquence	Source de protéine
<u>T Y Q P T R A I V</u>	Influenza PR8 NP 147-154
<u>S Y F P E I T H I</u>	self-peptide de P815
<u>I Y A T V A G S I</u>	Influenza JAP HA 523-549
<u>V Y Q I L A I Y A</u>	Influenza JAP HA 523-549
<u>- - - N V G T Y V</u>	Influenza PR8 HA 518-528
<u>R Y L K N G K E T</u>	HLA-A24 170-18233
<u>K Y Q A V T T T L</u>	HLA-Cw3 170-186
<u>S Y I P S A E K I</u>	Antigène de tumeur P815
<u>S Y V P S A E Q I</u>	Plasmodium berghei CSP 249-260
	Plasmodium yoelii CSP 276-288
Epitopes connus, alignés	
<u>A S N E N M E T M</u>	Influenza NP366-374
<u>S G P S N T P P E</u> IS	Adénovirus E1A
<u>S G V E N P G G Y</u> CLS	Lymphocyte choriomeningitis virus GP 272-293
<u>S A I N N Y . . .</u>	Virus simien 40 T 192-211
Epitopes connus, alignés	
<u>P G Y V Y Q G L</u>	Virus de la stomatite vésiculaire NP 52-59
<u>S I I N F E K L .</u>	Ovalbumin 258-276S
<u>A P G N Y P A L .</u>	Virus Sendai NP 321-332
Epitopes connus, alignés	
<u>I L K E P V H G V</u>	Transcriptase inverse de VIH
<u>F L Q S R P E P T</u>	Protéine 446-460§ Gag de VIH
<u>A M Q M L K E . .</u>	Protéine 193-203§ Gag de VIH
<u>Q M K D C T E R Q .</u>	Protéine 418-443§ Gag de VIH

Antigènes spécifiques d'une tumeur de type mélanome (épitopes) reconnus
par des CTL humains

Gène	Elément de restriction	Séquence d'acides aminés
MAGE-1	HLA-A1	EADPTGHSY (SEQ ID NO:)
	HLA-Cw1601	SAYGEPRKL (SEQ ID NO:)
MAGE-3	HLA-A2	FLWGPRAIV (SEQ ID NO:)
	HLA-A1	EVDPIGHLY (SEQ ID NO:)
BAGE	HLA-Cw1601	AARAVFLAL (SEQ ID NO:)
GAGE	HLA-Cw6	YRPRPRRV (SEQ ID NO:)
Tyrosinase	HLA-A2	MLLAVLYCL (SEQ ID NO:)
	HLA-A2	YMNGTMSQV (SEQ ID NO:)
	HLA-B44.03	SEIWRDIDF (SEQ ID NO:)
	HLA-A24	?
MART1/MELAN-A	HLA-A2	AAGIGILTV (SEQ ID NO:)
	HLA-A2	GIGILTVIL (SEQ ID NO:)
	HLA-A2	ILTVILGVL (SEQ ID NO:)
GP100/pMEL-17	HLA-A2	YLEPGPVTA (SEQ ID NO:)
	HLA-A2	LLDGTATLRL (SEQ ID NO:)
GP75/TRP-1	HLA-A31	?

Peptides spécifiques d'une tumeur et éléments de restriction
de HLA correspondants

Séquence	Nom	Protéine	Position	Restriction	CTL	Réf.
EADPTGHSY	MZ2-E	MAGE-1	161-169	HLA-A1	82/30	(59)
EVDPIGHLY	MZ2-D	MAGE-3	168-176	HLA-A1	20/38	(60)
MLLAVLYCL		Tyrosinase	1-9	HLA-A2	210/9	(61)
YMNGTMSQV		Tyrosinase	368-376	HLA-A2	IVSB	(62)
AAGIGILTV	MART-1	MART-1		HLA-A2	IVSB	(63)
AAGIGILTV	Melan-A					(64)
AAGIGILTV						(65)
LLDGTATLRL		gp-100		HLA-A2		(66)
YLEPGPVTA	946	Pmel 17		HLA-A2		

- 15 Les antigènes décrits dans les tableaux ci-dessus sont simplement représentatifs d'antigènes qui peuvent être présentés à des récepteurs cellulaires en association avec les déterminants modifiés du CMH ou les molécules dérivées du CMH de la présente invention. D'autres antigènes pouvant
- 20 former des complexes avec les déterminants peuvent être également utilisés. L'utilisation à la fois d'un test de liaison peptidique direct (PBA) et de l'inhibition du test de liaison peptidique (IPBA), les interactions physiques entre les molécules de HLA et les peptides peuvent être
- 25 analysées. En particulier, les tests peuvent être réalisés comme suit.

Test direct de liaisons peptidiques (PBA). Des puits de plaques de microtitrage sont prétraités avec 100 µl de glutaraldéhyde à 2,5 % dans de l'eau distillée pendant 2 heures à 20°C, ils sont lavés avec de l'eau distillée et
5 revêtus pendant 16 heures à 4°C avec 100 µl de peptide dilué à 5 µg/ml, soit dans un tampon carbonate-bicarbonate, pH 9,6, soit dans du PBS, pH 7,4 ou pH 7,5. Les sites libres restants sont bloqués par incubation pendant 2 heures à 20°C avec du BSA dilué à 1 % dans du PBS contenant du Tween 20 à
10 0,05 % (Tw) et 0,02 % d'azoture de sodium. Après lavage, on ajoute des molécules de ^{125}I -HLA purifiées (100 µl contenant $1,5 \times 10^5$ cpm, 10^{-9} M) diluées dans du PBS contenant 1 % de BSA, 0,05 % de Tw, 0,02 % d'azoture de sodium, 1 mM de PMSF et 10 µg/ml d'inhibiteur de trypsine et on incube pendant 20
15 heures à 20°C. Après lavage approfondi, on mesure par comptage la radioactivité de chaque puits.

Inhibition du test de liaison peptidique (IPBA). On incube des concentrations de 0,1-100 µM de peptides compétiteurs dans des tubes pendant 0-3 heures à 20°C avec
20 ^{125}I -HLA (10^{-9} M) dilué dans PBS-BSA-Tw contenant des inhibiteurs de protéases tels que mentionnés ci-dessus. Ensuite on introduit le mélange dans les puits de la plaque de microtitrage revêtu avec un peptide qui présente une liaison significative aux molécules de HLA dans le test
25 direct et on incube la plaque pendant 20 heures à 20°C. Après lavage approfondi, on mesure par comptage la radioactivité de chaque puits et on calcule le pourcentage d'inhibition.

Compétition entre peptides dans un test lytique. On
30 génère des CTL anti-peptide humains (37). Brièvement, on stimule $6-8 \times 10^7$ PBMC avec 100 µg d'un peptide synthétique dans 10 ml d'un milieu de culture (RPMI 1640 complété avec 100 µg/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 2 mM de L-glutamine, 2 mM d'acides aminés non essentiels,

1 mM de pyruvate de sodium, 10 mM de Hepes et 10 % d'un pool de sérum humain AB inactivé par la chaleur). Après incubation pendant 7 jours, on effectue une stimulation secondaire in vitro en mélangeant $5-7 \times 10^6$ cellules effectrices avec $2-3 \times 10^7$ PBMC irradiés (4000 rads) autologues dans 10 ml de milieu de culture contenant 50-100 µg de peptides.

Dans la plupart des cas, les épitopes de lymphocytes T sont reconnus en association avec seulement quelques éléments de restriction du CMH, sinon un seul de ces éléments. Au contraire, certains peptides peuvent être reconnus en association avec plusieurs molécules de H-2 ou HLA. De plus, un seul peptide peut être reconnu par les lymphocytes T restreints par les CMH à la fois de classe I et de classe II. Etant donné que les molécules de classe I et de classe II ont une structure tertiaire prévue similaire, comprenant un seul site de liaison antigénique, les interactions entre les peptides et ces deux sites de molécules sont également comprises dans la présente invention. De plus, il faut noter que la présente invention englobe la liaison d'antigènes normalement associés avec le CMH d'une seule espèce, telle que H-2, aux déterminants modifiés du CMH d'une autre espèce, telle que HLA.

La formation de compositions comprenant des antigènes liés aux déterminants modifiés du CMH selon l'invention peut être basée sur des peptides connus pour être antigéniques dans des maladies telles que le SIDA (protéines ou peptides ga, nef, vif, rev, vpr ou env), la sclérose en plaques (protéines à base de myéline), le choc toxique (bactérie) ou le venin de serpent (région antigénique pour un venin de serpent particulier, à base d'alcaloïdes et à base de protéines ; le traitement habituel de la morsure de serpent est basé sur l'administration d'anticorps dirigés contre un venin particulier). Ces compositions peuvent être formulées

de façon à permettre que le potentiel de reconnaissance de la cible d'une cellule d'un système immunitaire soit redirigé spécifiquement vers l'antigène en présentation avec le déterminant modifié du CMH. Il faut noter que des
5 librairies constituées de différents déterminants modifiés du CMH selon l'invention et des antigènes associés peuvent être préparées. Ainsi, il est possible de formuler des compositions comprenant deux ou plus de deux membres de la librairie en une combinaison ou quantité quelconque, comme
10 pour cibler différents récepteurs simultanément ou séquentiellement.

Alors que la présente invention a été décrite en se référant à l'utilisation de peptides pour lier des déterminants modifiés du CMH, il est également possible
15 d'utiliser d'autres matériels antigéniques. Par exemple, des peptides combinés à des haptènes en général peuvent être utilisés. Les peptides peuvent être combinés à des métaux tels que le nickel. Des peptides peuvent être également combinés à des hydrates de carbone. Certains produits
20 chimiques, tels que l'arsonate de p-benzoyle, se lient également directement au sillon des matériels du CMH. Des antigènes appropriés sont passés en revue par P. Kourilsky et J.M. Claverie dans "Advances in Immunology" (1989).

De même, les déterminants modifiés du CMH de l'invention
25 peuvent être chargés d'immunotoxines classiques et dirigés contre un lymphocyte T associé à une maladie autoimmune afin de désactiver le lymphocyte T. La toxine de la diphtérie ou des sous-ensembles de celles-ci et la toxine de Pseudomonas A sont des exemples d'immunotoxines appropriées.

30 CMH en association avec un antigène peptidique

Le degré de charge d'antigène peptidique du déterminant modifié du CMH est variable. Le déterminant modifié du CMH est employé typiquement en une quantité d'environ 10 à

environ 1 000 µg/ml et le peptide est utilisé en une quantité d'environ 10 à environ 1 000 µg/ml.

L'association physique de peptides antigéniques et de déterminants modifiés du CMH de classe I et de classe II, selon l'invention, ou de tout CMH utilisé dans la présente invention, peut être suivie en utilisant le test direct de liaison peptidique (PBA) en phase solide ou l'inhibition du test de liaison peptidique (IPBA) dans lequel le peptide compétiteur est présent dans une phase soluble. Ces deux tests sont connus dans la technique. D'autres tests mesurant les variations de fluorescence d'un peptide marqué approprié sous forme soluble lorsqu'il se lie à un CMH soluble ou à un déterminant modifié du CMH sont également disponibles et connus dans la technique. L'aptitude de différents peptides à inhiber l'activité lytique de lymphocytes T cytolytiques antiviraux humains vis-à-vis de cellules incubées avec le peptide cible correspondant peut être également étudiée comme une mesure de l'aptitude et de l'efficacité de la liaison antigénique et de la présentation de l'antigène.

Liaison de cellules au complexe CMH/peptide

Dans un mode de réalisation, la présente invention décrit, pour la première fois, la quantification et la purification de lymphocytes T à partir d'une population cellulaire complexe, selon leur spécificité (tableau 1). Les inventeurs ont en effet montré que des complexes CMH/peptide appliqués en revêtement induisent l'adhésion de lymphocytes T antigène-spécifiques. L'utilisation de cette technique permet ainsi d'enrichir une population de cellules T complexe en lymphocytes spécifiques d'un antigène. On a utilisé l'invention, dans un de ses modes de réalisation, pour la caractérisation fonctionnelle de lymphocytes T spécifiques d'une tumeur, prélevés sur un site tumoral. On a également utilisé les lymphocytes T purifiés et multipliés

pour protéger des animaux contre le développement tumoral dans des conditions qui sont normalement létales chez l'animal. Dans un système de modèle tumoral (P815-Cw3), il est montré qu'entre 1 et 2 % de cellules infiltrant la tumeur sont réellement spécifiques de la tumeur. Néanmoins, cette petite fraction présente une forte activité anti-tumorale à la fois in vitro et in vivo. Ainsi, une fois purifiés par adsorption sur des complexes SC-Kd/Cw3 et après amplification in vitro, les caractéristiques des lymphocytes T fournis par la présente invention présentent des avantages nets dans les traitements thérapeutiques. De même, une information importante dans l'analyse de la réponse des lymphocytes T à des antigènes spécifiques chez les animaux peut être obtenue à partir des lymphocytes T de la présente invention. L'homme du métier reconnaît l'importance de ces résultats dans le domaine des approches thérapeutiques pour attaquer le développement tumoral chez un animal et les approches de diagnostic pour identifier les tumeurs présentes chez un animal.

De plus, on n'a pas observé de mortalité cellulaire massive pendant la purification (tableau 1). Lorsque des cellules purifiées sont amplifiées in vitro, on peut ajouter à la culture des cytokines et des splénocytes irradiés qui peuvent éviter l'induction de l'apoptose. Ainsi, les inventeurs ont également fourni des conditions de purification et de culture améliorées pour la multiplication des lymphocytes T, en particulier des populations de lymphocytes T spécifiques d'un antigène. Les modes opératoires décrits peuvent être également sélectionnés pour des lymphocytes T d'avidité élevée, exprimant un taux élevé de TCR et de CD8 et/ou de TCR ayant une grande affinité. L'identification et la caractérisation des lymphocytes T d'avidité élevée peut fournir une information importante concernant l'immunogénicité de certains antigènes. Les méthodes et tests de diagnostic destinés à déterminer la

présence de lymphocytes T d'avidité élevée peuvent être extrapolés par l'homme du métier à partir de la divulgation de la présente invention.

De nombreuses études ont montré que des lymphocytes
5 infiltrant la tumeur (TIL) peuvent réagir in vitro avec des
cellules cancéreuses autologues (6). Chez l'homme, des TIL
ont été isolés à partir de patients et utilisés pour
l'immunothérapie adoptive après amplification in vitro avec
10 IL-2. Des réponses objectives ont été observées pour un
faible pourcentage de patients traités. Plusieurs hypothèses
non exclusives ont été proposées pour expliquer ces
résultats décevants. Une d'entre elles est que seulement une
petite fraction des TIL peut être réellement spécifique de
15 la tumeur. Un autre facteur est l'anergie. Les tumeurs
peuvent être souvent faiblement immunogéniques et ainsi,
n'activent pas suffisamment la multiplication des
lymphocytes T. L'absence de molécules co-stimulatrices
telles que B7.1 ou B7.2, ou la présence de signaux
20 inhibiteurs (56) ainsi que la sécrétion de facteurs
immunosuppresseurs tels que TGF- β et IL-10 (40), ont été
décrits comme influençant la réponse des lymphocytes T (pour
une revue à ce sujet, voir (41)). De plus, l'amplification
in vitro de TIL non purifiés a été décrite récemment comme
réduisant l'activité anti-tumorale (45). En fait, on
25 pourrait s'attendre à ce que l'occupation du TCR en
l'absence de co-signal induise l'anergie ou même l'apoptose
des lymphocytes T (46) plutôt que leur activation.

Le succès limité des études concernant l'injection de
TIL pourrait être également dû à des cellules anergiques à
30 l'intérieur de la tumeur. De tels TIL anergiques pourraient
entrer en compétition pour des cytokines et pour accéder aux
cellules cibles tumorales. L'anergie pourrait résulter de la
modulation du TCR ou de CD8, comme démontré dans le cas de
tolérance extrathymique à des auto-antigènes (42) et à des

non auto-antigènes (43). De plus, certaines cellules pourraient maintenir un taux normal de TCR et d'expression de co-récepteur, mais elles présentent un bloc sur le trajet de transduction de signal (44).

5 Les inventeurs démontrent qu'il est possible d'enrichir des TIL en lymphocytes T spécifiques d'une tumeur et d'augmenter leur activité cytotoxique, même lorsque ces cellules spécifiques représentent une petite fraction de
10 celles ayant infiltré la tumeur. Le fait de trier les lymphocytes spécifiques d'un peptide avant et/ou après amplification in vitro devrait permettre de réaliser des immunothérapies adoptives mieux contrôlées chez l'homme et chez les animaux. La molécule monocaténaire soluble de HLA-A2, décrite ci-après, permet de réaliser de telles
15 immunothérapies, comme l'indiquent les résultats et les données ci-après. Comme mentionné ci-dessus, bien que certains des peptides cités en exemple dans la présente description soient issus de tumeurs, l'enseignement de cette publication dans son ensemble peut être également utilisé
20 pour déterminer les réponses antivirales et purifier des lymphocytes T spécifiques de cellules infectées par un virus. Enfin, l'isolement de lymphocytes T spécifiques d'un peptide par adsorption sur des complexes CMH/peptide devrait ouvrir de nouvelles voies pour l'analyse de répertoires de
25 lymphocytes T par couplage d'approches structurelles et d'études fonctionnelles.

Dans la description des modes de réalisation ci-après, on utilise des complexes recombinants CMH/peptide pour purifier et quantifier des lymphocytes T en fonction de la
30 spécificité de leur TCR. Comme modèle, on a étudié sur des souris DBA/2 la réponse fortement ciblée des lymphocytes T à un mastocytome P815 transfecté avec le gène HLA-Cw3 humain (appelé ci-après P815-Cw3) (11-13). Etant donné que les séquences TCR β amplifiées dans cette réponse présentent une

diversité très limitée, les lymphocytes T spécifiques pourraient être suivis indépendamment par cytométrie ou en utilisant une technique de PCR développée dans notre laboratoire (12, 14). On a élargi cette approche à des tumeurs solides. On a isolé des lymphocytes T spécifiques d'une tumeur à partir d'un site tumoral et on a analysé leur caractéristiques structurelles et fonctionnelles. Il est montré que des lymphocytes T spécifiques d'une tumeur ne représentent qu'une petite fraction des TIL. Après purification par adsorption sur des complexes spécifiques CMH/peptide, on réinjecte les TIL spécifiques d'une tumeur à l'animal receveur, où ils déploient une protection anti-tumorale puissante. Ainsi, la présente invention répond à un besoin de la technique pour une méthode efficace de purification et d'isolement, en grandes quantités, de lymphocytes T spécifiques d'un antigène.

Tableau 1

	nombre de cellules x 10 ⁻⁶ (pourcentage) *		Enrichisse- ment #	Rendement en % §
	Avant	Après		
CD8+	8,7 (21,7)	6,5 (100)	4,6	74,7
CD4+	4 (9,9)	<0,01	-	-
CD8+VB10+	8,2 (20,4)	6,5 (100)	4,9	79,3
CD4+V B10+	0,2 (0,5)	<0,01	-	-
cellules non-T	27,4 (68,5)	<0,01	-	-
total	40,1 (100)	6,5 (100)	-	-

Légende correspondant au tableau 1 :

Caractérisation phénotypique de PEL issus de souris immunisées contre P815-Cw3 avant et après adsorption sur des complexes SC-Kd Cw3.

- 5 On purifie des PEL sur un gradient de percoll et on analyse leur expression de CD8, CD4 et VB10 à la surface cellulaire par cytométrie, avant et après adsorption sur des complexes SC-Kd/Cw3.
- 10 * Le nombre total de cellules est déterminé avant et après purification. Le pourcentage des différents sous-ensembles cellulaires est calculé en utilisant la version 1.2.1 du logiciel CellQuest (Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Belgique). Le nombre absolu de cellules dans chaque sous-ensemble est obtenu par multiplication du nombre total de
- 15 cellules par le pourcentage du sous-ensemble.

L'enrichissement est obtenu en divisant le pourcentage du sous-ensemble de la population cellulaire totale après adsorption sur SC-Kd/Cw3 par le pourcentage obtenu avant adsorption.

- 20 § Le pourcentage de rendement est obtenue en divisant le nombre absolu de cellules du sous-ensemble après adsorption du SC-Kd/Cw3 par ce même nombre avant adsorption, et multiplication du résultat par 100.

- 25 *Induction de CTL primaires spécifiques utilisant des complexes CMH/peptide.* La stimulation de lymphocytes T non sensibilisés est contrôlée par des cellules présentatrices d'antigènes spécialisées (APC) qui expriment des molécules du CMH et diverses molécules co-stimulatrices. Pour
- 30 déterminer l'exigence minimale pour des lymphocytes T stimulateurs, on utilise des APC artificielles (billes) comprenant un complexe CMH/peptide choisi, de préférence avec une densité élevée de complexes CMH/peptide. La

molécule monocaténaire soluble de HLA-A2.1 humaine (SC-A2) est obtenue par ingénierie, en connectant les trois premiers domaines de la chaîne lourde A2.I à la b-microglobuline humaine par l'intermédiaire d'un espaceur ayant une longueur
5 de 15 acides aminés, et elle est sécrétée dans le milieu de culture par des cellules basophiles de rats (RBL). Elle peut être purifiée par chromatographie d'affinité en utilisant l'anticorps monoclonal W6.32 anti-HLA-A2 et présente des fonctions biologiques.

10 On a montré que SC-A2 purifié se lie spécifiquement à des peptides antigéniques restreints par A2 et ne se lie pas à des peptides murins restreints par H2-Kb ou H2-Kd. Les complexes CMH/peptide chargés avec une haute densité sur un support solide induisent certains lymphocytes T CD8 à
15 produire des réponses prolifératives pour produire de la cytokine (IL-2), et à présenter une activité cytotoxique vis-à-vis d'antigènes peptidiques définis in vitro. De plus, SC-A2 chargé en peptides peut induire in vitro des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) primaires spécifiques d'un
20 peptide, issus de cellules naïves PBL HLA-A2.1 de donneurs sains. Le complexe CMH/peptide enrobant les billes agit également en tant qu'APC pour éliciter des réponses primaires à des antigènes spécifiques d'une tumeur, chez la souris.

25 SC-A2 présente ainsi des caractéristiques similaires à celles de SC-Kd en ce qui concerne sa structure et sa fonction

Les peptides synthétiques qui constituent un épitope de CTL peuvent se lier directement à la surface cellulaire de
30 molécules de CMH de classe I. Apparemment, aucun événement intracellulaire n'est impliqué ou requis. L'association de peptides de classe I à la surface cellulaire dépend essentiellement de la présence de molécules de classe I

vides qui portent des peptides endogènes à liaison médiocre. Sur la plupart des types cellulaires, seule une petite fraction de la surface cellulaire totale de la molécule de classe I est vide. Par conséquent, charger la surface
5 cellulaire de peptides liants de classe I est inefficace dans la plupart des cellules.

La molécule recombinante du CMH de classe I décrite précédemment (SC-Kd) a été produite et purifiée comme une molécule monocaténaire soluble. (Voir les demandes U.S. en
10 cours d'examen 07/801818, 08/487650 et/ou 08/370476). SC-Kd fonctionnel peut être obtenu en grande quantité à partir de cellules CHO transfectées de manière appropriée et chargées avec le peptide voulu.

La disponibilité de ces deux structures (SC-A2 et SC-Kd), ou de toute autre structure produite selon la présente
15 description, crée une source de molécules du CMH qui peuvent être chargées avec un antigène spécifique. Lorsqu'on utilise ces molécules de CMH chargées, couplées à un support solide, il est généré une APC artificielle qui peut imiter l'APC
20 naturelle. Ainsi, on peut diriger toutes les fonctions connues d'APC vers un peptide ou antigène particulier. Les APC artificielles et les méthodes qui les utilisent pour obtenir des CTL spécifiques d'un antigène sont des aspects importants de la présente invention.

Par exemple, ces molécules du CMH fonctionnent de façon à lier un peptide spécifique et peuvent induire des CTL
25 spécifiques primaires. En outre, les caractéristiques structurales de ces CTL ont été déterminées par analyse de la chaîne TCR-B, qui a révélé des réarrangements très similaires, et même identiques, à ceux trouvés chez les CTL
30 générés par immunisation in vivo. Ces CTL primaires sont capables de reconnaître un peptide endogène sur une cellule tumorale syngénique chez la souris et de reconnaître des

cellules infectées par VIH chez l'homme. Ces CTL sont également utilisés pour le transfert adoptif cellulaire conduisant au rejet de tumeurs in vivo.

5 L'aptitude des complexes SC-Kd et SC-A2/peptide à activer des précurseurs de CTL peptide-spécifiques a été étudiée in vitro. On a ainsi mis en évidence qu'il est possible d'induire une expansion de CTL spécifiques de peptides de HLA-CW3 et du virus influenza dans des cultures de cellules naïves de rate de souris stimulées par des
10 complexes SC-Kd/peptide couplés sur des billes. L'efficacité de ces derniers s'avère comparable à celles d'APC connues, comme les cellules dendritiques.

15 *Activation totale de cellules T naïves CD8+ en l'absence de co-stimulation*

La co-stimulation est considérée comme critique pour obtenir une induction optimale des réponses des cellules T. Les modèles courants suggèrent que l'activation des cellules
20 T naïves est habituellement déterminée par une combinaison de 2 signaux.

Le signal 1 fonctionne à travers le complexe TCR antigène-spécifique. Le signal 2 dépend d'une interaction entre des
25 molécules spécialisées exprimées à la surface de la cellule T et leurs contre-parties sur l'APC (signal 2).

Comme indiqué dans la présente description, dans certaines conditions, les cellules T n'ont pas besoin de co-
30 stimulation, en particulier via la voie médiée par CD28. Pour vérifier la délivrance possible de co-signaux par l'environnement cellulaire ou la possible contribution de molécules d'adhésion, un système expérimental, dépourvu de cellules, a été développé, selon l'invention, pour
35 l'activation de cellules T.

On a utilisé SC-Kd chargé avec le peptide HA du virus de l'influenza pour stimuler des splénocytes naïfs CD8+ très purifiés, provenant de souris transgéniques pour un TCR
5 spécifique pour le peptide HA. Les résultats obtenus ont montré qu'un tel stimulus acellulaire est suffisant pour donner naissance à des cellules présentant un phénotype activé, d'une manière dose-dépendante. Ces cellules prolifèrent, secrètent des cytokines et présentent une
10 activité cytotoxique en l'absence d'une co-stimulation et d'IL-2 exogène. Ainsi, l'invention démontre que des splénocytes CD8+ peuvent être totalement activés par leur seul engagement TCR. Le degré de pureté des cellules T CD8+ obtenues est très élevé, atteignant 98,5% dans les
15 conditions d'expérimentation.

Ces résultats débouchent sur des applications en immunothérapie et la compréhension des mécanismes de self - tolérance qui font également partie de l'invention. En particulier, dans la conception de vaccins basés sur des
20 peptides, on tiendra compte de différences de besoin de co-stimulation pour les cellules CD4+ et celles CD8+ et de l'exigence de co-stimulation peptide-spécifique.

Liaison à des récepteurs cellulaires de lymphocytes. Les déterminants modifiés du CMH de classe I et de classe II
25 selon l'invention, et les compositions comprenant des antigènes liés aux déterminants modifiés, sont reconnaissables par les récepteurs sur les lymphocytes T.

En particulier, la structure de reconnaissance d'antigène et de CMH des lymphocytes T est appelée ici
30 récepteur de cellules T. Le récepteur de cellules T impliqué dans la reconnaissance d'antigènes et de CMH est caractérisé dans le tableau 2. Des régions variables des chaînes a et b forment le site de liaison antigénique et déterminent également la spécificité du CMH. En présence d'antigènes et

de CMH, le lymphocyte T est activé. Il en résulte la phosphorylation d'au moins deux sous-ensembles du complexe récepteur, les chaînes δ et ϵ .

Tableau 2. Structures de surface impliquées dans la reconnaissance d'antigène par des lymphocytes T humains

Chaînes	Masse moléculaire		Fonction
	Non réduite	Réduite	
A. Complexe récepteur de reconnaissance des lymphocytes T α et β	90 000	41 000-43 000 (deux chaînes)	Double reconnaissance d'antigène et de CMH
T ₃ - δ	23 000	23 000	Phosphorylé pendant l'activation cellulaire
γ	20 000-23 000	20 000-23 000	Inconnu
ϵ	20 000	20 000	Phosphorylé pendant l'activation cellulaire
ζ	32 000	16 (deux chaînes)	Inconnu
B. T ₄ (CD4)	62 000	62 000	Reconnaissance du CMH de classe II
C. T ₈ (CD8)	76 000	31 000-33 000	Reconnaissance du CMH de classe I

5 Deux autres chaînes à la surface des lymphocytes T, T₄ (CD4) et T₈ (CD8), sont associées à la reconnaissance des déterminants modifiés du CMH de classe I ou de classe II selon l'invention, sans entrer en interaction avec l'antigène. Ces molécules peuvent se lier normalement à des

10 déterminants non-polymorphiques (constants) sur des produits

géniques de classe I ou de classe II de la cellule présentant l'antigène. Ces molécules peuvent être également associées au récepteur de cellules T.

Un résumé de la relation entre les molécules du CMH de classe I et de classe II et le type de lymphocytes T immunoréactifs est indiqué dans le tableau 3.

Tableau 3. Restrictions de l'activation des cellules lymphoïdes

Fonction	Phénotype	Restriction
T auxiliaire	$CD4^+CD8^-$	CMH de classe II + antigène
DTH	$CD4^+CD8^-$	CMH de classe II + antigène
CTL	$CD4^-CD8^+$ ou $CD4^+CD8^-$	CMH de classe I ou II + antigène
Suppresseur	$CD4^-CD8^+$	CMH de classe I ou II + antigène
		CMH de classe I

L'activation de cellules auxiliaires T et des cellules effectrices à hypersensibilité retardée (DTH) sont restreintes par les antigènes et les molécules du CMH de classe II ; les activités du CTL sont restreintes par les antigènes et les molécules du CMH de classe I ou de classe II. La suppression peut être restreinte par la classe I ou non restreinte. Le phénotype de surface ($CD4$ ou $CD8$) est en corrélation essentiellement avec la reconnaissance de CMH de classe II ($CD4^+$) ou de classe I ($CD8^+$).

Si l'on considère le rôle régulateur important des cellules inductrices restreintes par la classe II (dont

toutes sont $CD4^+$), il n'est pas surprenant qu'un virus tel que le virus apparenté au SIDA, qui infecte les lymphocytes T par l'intermédiaire du marqueur CD4 et par conséquent, diminue sélectivement la population de CD4, peut
5 causer l'immunosuppression sévère et d'autres anomalies de la croissance des lymphocytes observées chez les malades du SIDA. La présente invention devrait permettre d'obtenir des lymphocytes T spécifiques des cellules infectées par VIH et d'utiliser ces cellules dans la recherche et développement
10 concernant le traitement du SIDA.

La présente invention devrait également permettre d'imiter la liaison d'antigènes aux chaînes α et β ou aux chaînes δ réceptrices de cellules T. Par liaison croisée des récepteurs avec le déterminant modifié de l'invention, on
15 facilite l'activation des lymphocytes T. La présente invention permet ainsi de stimuler ou de renforcer la fonction du système immunitaire.

Ainsi qu'il a été largement exposé ci-dessus, l'invention vise donc plus spécialement des méthodes, produits et kits mettant en oeuvre des complexes
20 CMH/peptide. Elle vise ainsi une méthode de détection de la présence ou de l'absence d'un lymphocyte antigène-spécifique, comprenant les étapes consistant à fournir un complexe comprenant un déterminant modifié du complexe
25 majeur d'histocompatibilité (CMH), en association avec un antigène peptidique spécifique ;

à coupler ledit complexe à un support solide ;

à incuber le complexe couplé à un support solide avec un échantillon biologique dans des conditions appropriées pour
30 lier un lymphocyte à un antigène ou à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité ; et

à détecter la présence ou l'absence de lymphocytes liés au complexe couplé à un support solide.

Le déterminant du CMH modifié mis en oeuvre est avantageusement présent sous la forme d'un dimère ou d'un polymère d'ordre supérieur, ou d'un agrégat.

Dans cette méthode, l'antigène est choisi avec avantage dans le groupe d'antigènes essentiellement formé par les antigènes associés à des tumeurs, les antigènes dérivés d'un parasite, les antigènes dérivés de bactéries et les antigènes dérivés de virus tels que VIH, influenza, CMV, VPH, Hépatite A, Hépatite B, Hépatite non-A non-B et Hépatite C.

L'invention vise aussi une méthode de détection de la présence ou de l'absence d'un lymphocyte T spécifique d'une tumeur, comprenant les étapes consistant à fournir un complexe comprenant une molécule modifiée du complexe majeur d'histocompatibilité, en association avec un antigène spécifique de tumeur ;

à coupler ledit complexe à un support solide ;

à incuber ledit complexe couplé à un support solide avec un échantillon biologique ; et

à détecter la présence ou l'absence d'un lymphocyte T lié au complexe couplé à un support solide.

Dans les méthodes ci-dessus l'incubation comprend en outre une période d'environ 3 heures à environ 4°C, avec ou sans agitation douce, et la détection comprend en outre l'utilisation d'un concentrateur de particules magnétiques.

La méthode d'obtention, d'isolement ou de purification d'un lymphocyte T antigène-spécifique, fait également partie de l'invention. Cette méthode comprend les étapes consistant

à fournir un complexe constitué essentiellement par un déterminant modifié du complexe majeur d'histocompatibilité en association avec un antigène peptidique ;

à coupler le complexe à un support solide ;

- 5 à incuber ledit complexe couplé au support solide avec un échantillon biologique, de sorte que les lymphocytes T puissent se lier au complexe couplé au support solide ; et à séparer des autres cellules les lymphocytes T liés.

- 10 Entre également dans le champ de l'invention, une méthode de préparation d'un lymphocyte T cytotoxique antigène-spécifique, comprenant les étapes consistant

à fournir un complexe comprenant un déterminant modifié du complexe majeur d'histocompatibilité en association avec un antigène ;

- 15 à coupler le complexe à un support solide ; et

à mettre en contact le complexe couplé à un support solide avec un lymphocyte primaire.

- 20 L'antigène mis en oeuvre est avantageusement choisi dans le groupe d'antigènes essentiellement constitué par des antigènes spécifiques de tumeur, des antigènes dérivés du VIH, des antigènes dérivés du virus influenza et un antigène dérivé de bactéries.

- 25 Il s'agit en particulier d'un antigène choisi dans le groupe d'antigènes essentiellement constitué par des antigènes associés à des tumeurs, des antigènes dérivés d'un parasite, des antigènes dérivés de bactéries, et des antigènes dérivés de virus tels que VIH, influenza, CMV, VPH, Hépatite A, Hépatite B, Hépatite non-A non-B et Hépatite C.

L'invention vise également une méthode destinée à tuer une cellule, contenant un antigène spécifique de tumeur, comprenant l'étape consistant à mettre en contact un lymphocyte T cytotoxique tel qu'obtenu par la méthode ci-dessus de préparation de lymphocyte cytotoxique antigène-spécifique avec une cellule contenant un antigène spécifique de tumeur dans des conditions physiologiquement acceptables.

L'invention vise encore une méthode d'introduction d'un lymphocyte T cytotoxique dans un animal ou chez l'homme, comprenant l'étape consistant à fournir un lymphocyte T cytotoxique tel qu'obtenu par la méthode ci-dessus de préparation de lymphocyte cytotoxique antigène-spécifique et à injecter le lymphocyte T cytotoxique à l'homme ou à l'animal, conjointement avec une solution, un véhicule ou des excipients physiologiquement acceptables.

L'invention vise également une méthode d'anergisation d'un lymphocyte T antigène-spécifique, comprenant l'étape consistant à mettre en contact le lymphocyte T avec une composition comprenant un déterminant modifié du CMH, sous forme monomère en association avec un antigène peptidique.

L'invention comprend également une méthode d'élimination d'une population de lymphocytes T antigène-spécifiques, comprenant les étapes consistant

à fournir un complexe comprenant un déterminant modifié du CMH, en association avec un antigène peptidique ;

à coupler ledit complexe, à un support solide ; et

à introduire ledit complexe couplé à un support solide dans une population de lymphocytes T.

Dans ces différentes méthodes, mis à part la méthode destinée à tuer une cellule et celle d'introduction d'un lymphocyte T cytotoxique chez l'homme ou l'animal,

l'antigène peptidique est avantageusement lié par covalence au déterminant modifié du CMH ou à un espaceur du déterminant modifié du CMH.

Le déterminant modifié du CMH est avantageusement
5 présent sous la forme d'un dimère ou d'un polymère d'ordre supérieur ou d'un agrégat.

L'invention comprend en outre une molécule recombinante du CMH, comprenant SC-A2 ou SC-Kd.

Elle vise en particulier une molécule recombinante du
10 CMH, biologiquement fonctionnelle, possédant l'activité de stimulation des lymphocytes T et de présentation d'antigène d'une molécule HLA-A2 naturelle, comprenant un ou plusieurs domaines de la chaîne lourde de HLA-A2 liés, par covalence ou autrement, à une β 2-microglobuline, ou à un fragment de
15 β 2-microglobuline, par l'intermédiaire d'une région d'espaceur flexible.

Comme exposé plus haut, l'invention vise en outre, une méthode de diagnostic pour déterminer la concentration ou la
20 quantité relative de molécules solubles du CMH de classe I ou classe II dans un échantillon, comprenant les étapes consistant à utiliser une molécule recombinante, telle que définie ci-dessus, en tant que référence standard, à mettre en contact l'échantillon avec des anticorps spécifiques du CMH ou de la microglobuline, ou des deux, et à déterminer la
25 quantité de liaison dans l'échantillon, comparée à la liaison de la molécule recombinante.

Elle vise aussi un kit de diagnostic servant à identifier des peptides antigéniques capables d'être
30 présentés par une molécule A2 comprenant une molécule recombinante, telle que définie ci-dessus, et un peptide marqué, qui est capable de se lier à la molécule recombinante.

Avantageusement, la molécule recombinante se présente sous forme monomère ou sous forme dimère ou, de préférence, en tant que polymère en agrégats de ces formes.

- 5 L'invention vise en outre l'utilisation d'une telle molécule dans une méthode pour stimuler et développer sélectivement un clone de CTL spécifique à partir d'une source de lymphocytes T, comprenant l'étape consistant à mettre en contact la molécule recombinante chargée d'un
- 10 peptide spécifique avec un lymphocyte T.

Les compositions comprenant une molécule recombinante, telle que définie ci-dessus, avantageusement sous les formes indiquées, et un support solide sont également visées par l'invention.

- 15 Dans ces compositions, le support solide peut être formé de billes magnétiques.

D'autres méthodes entrent dans le champ de l'invention, à savoir

- 20 - une méthode d'utilisation d'une composition, telle que définie ci-dessus, pour induire in vitro des CTL primaires peptide-spécifiques, comprenant l'étape consistant à incuber une telle composition avec un peptide, suivie de l'étape consistant à mettre en contact la composition avec un PBL naïf.

- 25 Cette méthode comprend avantageusement l'addition d'une cellule stimulatrice, telle qu'un conA-blast activé par peptide.

Les CTL ainsi obtenus sont avantageusement utilisés pour lier une cellule porteuse d'antigène.

- une méthode de production d'anticorps spécifiques anti-HLA, comprenant l'étape consistant à introduire une molécule recombinante, telle que définie plus haut, dans un animal et à isoler ou purifier des anticorps issus du sérum de l'animal.

- une méthode de production d'une cellule productrice d'immunoglobuline par un animal, comprenant le fait d'introduire une molécule recombinante, telle que définie plus haut, dans un animal et à isoler ou purifier la cellule.

L'invention vise aussi un kit de diagnostic destiné à identifier la présence ou l'absence d'un anticorps spécifique anti-HLA dans un échantillon, comprenant une molécule recombinante, telle que définie plus haut, et un moyen de détection pour détecter la liaison d'anticorps spécifiques à la molécule recombinante.

Elle vise également une méthode de diagnostic destinée à identifier des peptides qui peuvent être présentés par une molécule A2 pour résulter en une réponse immunitaire dans un lymphocyte, comprenant le fait de mettre une molécule recombinante, telle que définie plus haut, en association avec un peptide, en contact avec un lymphocyte et à rechercher une réponse immunitaire.

L'invention vise aussi une méthode d'utilisation d'une molécule recombinante telle que définie plus haut pour stimuler une réponse immune spécifique ex vivo ou pour une activation directe de lymphocytes in vivo par injection de la molécule sous forme de revêtement de support quelconque.

BREVE DESCRIPTION DES DESSINS

La figure 1 représente l'orientation d'une molécule du CMH de classe I et d'une β_2 -microglobuline dans une membrane cellulaire.

La figure 2 représente l'orientation de la molécule du CMH de classe II dans une membrane cellulaire.

La figure 3A représente schématiquement un déterminant modifié du CMH de classe I.

La figure 3B est un schéma-bloc représentant un déterminant modifié du CMH de classe I et un espaceur liant par covalence les produits géniques du CMH à la β_2 -microglobuline.

La figure 4A représente un déterminant modifié du CMH de classe II.

La figure 4b est un schéma-bloc représentant les domaines d'un déterminant modifié du CMH de classe II lié par des espaceurs.

Figure 5 : adsorption sélective de cellules d'hybridomes T à des complexes CMH/peptide apparentés.

On marque les cellules d'hybridomes T 9.4 (spécifiques de $K^d/Cw3$) par incorporation de [méthyl- 3H]-thymidine et on les incube avec des billes magnétiques (dans un rapport des billes aux cellules de 5:1) couplées à SC- K^d chargé du

peptide indiqué. Ensuite, on sépare les cellules magnétiquement avec un concentrateur de particules magnétique. Le rendement en cellules est déterminé en mesurant la radioactivité associée aux billes. Les
5 déviations moyennes et standards des expériences effectuées en triple sont représentées.

La figure 6 représente la purification sélective de PEL exprimant VB10, par adsorption sur SC-K^d/Cw3.

Les PEL sont purifiés par adsorption sur SC-K^d/Cw3 et
10 l'expression de VB10 est analysée par cytométrie. L'histogramme en traits pleins correspond aux PEL adsorbés sur SC-K^d/Cw3. Le profil en tireté correspond aux PEL avant adsorption.

La figure 7 représente l'expression clonale et la
15 purification de TIL spécifiques de K^d/Cw3, analysées par PCR.

Les différentes populations cellulaires sont analysées comme décrit dans la section Matériels et Méthodes en utilisant une technique de PCR avec les couples d'amorces
20 indiqués. Des lymphocytes T spécifiques de K^d/Cw3, présentant la longueur caractéristique de CDR3B (6 acides aminés) peuvent être déjà identifiés avant purification (panneaux c et d). Des splénocytes issus de souris naïves DBA/2 (panneaux a et b) sont représentés comme exemples
25 d'animaux non immuns. Les lymphocytes T K^d/Cw3-spécifiques sont purifiés efficacement et spécifiquement (panneaux e et f).

La figure 8 représente des TIL purifiés par adsorption sur des complexes CMH/peptide apparentés, présentant une
30 activité de CTL accrue.

L'activité de CTL de TIL purifiés (b et d) et non purifiés (a et c) est testée sur P815 (carrés blancs) et P815-Cw3 (carrés noirs) avant (a et b) ou après (c et d) amplification pendant 10 jours in vitro.

5 La figure 9 représente des TIL purifiés par adsorption sur des complexes CMH/peptide apparentés, présentant une activité antitumorale accrue.

On injecte par voie sous-cutanée à des souris une dose létale de P815-Cw3 (panneau a), de P815 (panneau b) ou de
10 P198 (panneau c). Après 6 jours, on administre aux souris par voie intraveineuse 10^7 TIL non purifiés (carrés blancs), issus d'une tumeur identique, ou le même nombre de TIL ayant été purifiés par adsorption (carrés noirs) sur soit SC-K^d/Cw3 (panneau a), soit L^d/P1A (panneau b), soit SC-K^d/P198
15 (panneau c). Les souris témoins (cercles blancs) ne reçoivent que des cellules tumorales.

La figure 10 représente la séquence nucléotidique et d'acides aminés de SC-A2-15.

La figure 11A représente le gel (pistes 1-4) désignant
20 SC-A2 immunoprécipité, la flèche indiquant la taille prévue pour SC-A2.

La figure 11B représente un gel indiquant les comparaisons A et B de SC-A2 versus SC-Kd.

La figure 12 représente un test de liaison A2.1.

25 Un test destiné à quantifier des peptides liants A2.1, basé sur l'inhibition de peptides Fl0V standards marqués par radioactivité à des molécules SC-A2, comme décrit dans la section Test de liaisons peptidiques.

La figure 13A représente la spécificité de CTL induits
30 par induction primaire in vitro en utilisant des billes

revêtues avec des complexes peptidiques SC-K^d/Cw3 en tant que cellules présentatrices d'antigène (APC).

Les CTL primaires spécifiques de Cw3 lysent spécifiquement les cellules tumorales P815-Cw3 (triangle),
5 alors qu'il existe très peu de lyse non spécifique avec les cellules P815, qui n'expriment pas le gène HLA-Cw3 (cercle).

La figure 13B représente la spécificité de CTL induits par induction primaire in vitro en utilisant des billes revêtues avec des complexes peptidiques SC-L^d/P1A, en tant
10 que cellules présentatrices d'antigène (APC).

Les CTL primaires spécifiques de P1A lysent spécifiquement les cellules tumorales P815 qui expriment bien le gène P1A (triangle), alors qu'il existe très peu de lyse non spécifique avec les P1204, qui n'expriment pas le
15 gène P1A (carré).

Figure 14 : L'absence de cellules macrophages n'a pas d'influence sur l'induction primaire in vitro de CTL spécifiques d'un peptide en utilisant des billes revêtues avec des complexes peptidiques SC-A2/Pol-VIH en tant que
20 cellules artificielles présentatrices d'antigènes (APC).

En utilisant des billes revêtues avec des complexes peptidiques SC-A2/Pol-VIH en tant que cellules présentatrices d'antigènes (APC), des CTL spécifiques de Pol-VIH peuvent être induites à partir de cellules naïves
25 PBL HLA-A2 (carré) ainsi que de cellules naïves PBL HLA-A2 (carré), et PBL HLA-A2 naïves dépourvues de cellules macrophage. Dans toutes ces situations, on obtient une faible lyse non spécifique lorsqu'on utilise des billes revêtues avec simplement le peptide Pol-VIH, mais sans
30 molécules SC-A2 en tant qu'APC (cercle) de cellules naïves PBL HLA-A2 (triangle) de PBL HLA-A2 naïves épuisées en cellules macrophage.

Figure 15 : L'absence de cellules macrophages n'a pas d'influence sur l'induction primaire in vitro du CTL spécifique d'un peptide, utilisant des billes revêtues avec des complexes peptidiques SC-A2/MAGE3 en tant que cellules artificielles présentatrices d'antigènes (APC).

Lorsqu'on utilise des billes revêtues avec des complexes peptidiques SC-A2/MAGE-3. en tant que cellules présentatrices d'antigènes (APC), les CTL spécifiques de MAGE-3 peuvent être induites à partir de cellules naïves HLA-A2 PBL (carré) ainsi que de cellules naïves PBL HLA-A2 dépourvues de cellules macrophage. Dans les deux cas, on obtient une faible lyse non spécifique lorsqu'on utilise des billes revêtues avec seulement le peptide MAGE-3 mais sans molécules SC-A2 en tant qu'APC (cercle) de cellules naïves PBL HLA-A2 (triangle) de PBL HLA-A2 naïves épuisées en cellules macrophages.

Figure 16 : Représentation schématique de molécules ou déterminants modifiés du CMH. La séquence nucléotidique de l'insert d'ADN comprenant le déterminant recombinant du CMH SC-A2 avec un espaceur de 15 acides aminés (les trois premiers domaines de l'ADNc de la chaîne lourde de HLA-A2.1 fusionnés à la séquence codante de la β_2 -microglobuline humaine par l'intermédiaire d'un linker flexible de 15 acides aminés).

Figure 17 : Résonance plasmonique de surface de la molécule SSC-A2 utilisant des AcM BB7.2 (anti-HLA-A2,-A69) et B2C16.2 (anti- β_2 -microglobuline humaine). Ces résultats indiquent que la molécule présente à la fois HLA-A2 et des déterminants sérologiques β_2 -m humains.

Figure 18A : Liaison de molécules F10V, radiomarquées, à SSC-A2. Le peptide marqué se lie à l'échantillon SSC-A2 (barre hachurée) et ne se lie pas au témoin (en traits pleins).

Figure 18B : Inhibition compétitive de la liaison de peptides à des molécules SSC-A2. Les peptides restreints par HLA-A2 (F10V, 19V et A9L) présentent une inhibition pratiquement complète du peptide marqué, tandis que les peptides restreints par H-2Kb (R8L OVA) et H-2Kd (Cw3 Y8I) ne présentent pas cette caractéristique.

Figure 19 : Incorporation directe de ^3H -thymidine ou sécrétion d'IL-2 par CTL NA17 221, présentant la réponse proliférative des CTL au peptide restreint de manière appropriée. La stimulation spécifique est mesurée en termes d'incorporation directe de ^3H -thymidine par CTLNA 17221 (panneau A) ou sécrétion d'IL-2 (panneau B)

Figures 20A et B : activité cytotoxique sur différentes cellules cibles T2 chargées en peptide pour le CTL stimulé avec des complexes SSC-A2/M58-66. Les résultats indiquent une lyse spécifique des cellules portant le peptide approprié.

Figure 21 : Analyse des répertoires de TCR VB17 et VB2 en utilisant la technologie d'immunoscopie très sensible. Dans les panneaux A et B, on observe un pic majeur dans le répertoire VB17 correspondant à un CDR3 de 8 acides aminés de long, indiquant une expansion dominante de CTL spécifique en corrélation avec la lyse spécifique M58-66 montrée dans la figure 20. Les VB2 des panneaux A et B présentent un répertoire polyclonal par son profil Gaussien.

Le témoin des cellules non stimulées, panneau C, exhibe également un profil de type de Gauss.

Figure 22 : Spécificité d'un essai de liaison de peptide restreint par HLA-A2.1. Dans 22A, on a représenté la liaison du peptide F10V radiomarké à des molécules SC-A2 et dans 22B, l'inhibition de compétition de la liaison des peptides aux molécules SC-A2

Figure 23 : Incorporation directe de ^3H -thymidine ou de sécrétion de IL-2 par CTL NA 17221 montrant une réponse proliférative du CTL au peptide restreint de manière appropriée

- 5 Figure 24 : Induction de CTL spécifiques par des complexes SC-Kd/peptide couplés à des billes ou à des cellules dendritiques

Figure 25 : Induction de CTL spécifiques par des complexes SC-A2/peptide couplés à des billes

- 10 Figure 26 : Répertoire TCR-BV10 de CTL induits avec des complexes SC-Kd/CW3 couplés à des billes et avec des cellules dendritiques activées par CW3

- 15 Les CTL ont été induits comme décrit en rapport avec la figure 24. L'ARN total a été extrait et l'ADNc amplifié en utilisant des amorces BV10 et BC-spécifiques. Après marquage avec une amorce fluorescente BC-spécifique, la distribution de taille du produit a été résolue dans un gel acrylamide dénaturant dans un séquenceur.

- 20 Figure 27 : Répertoires TCR BV17 et BV2 de CTL induits par SC-A2/M 58-66 couplé sur des billes.

Figure 28 : Adhésion sélective de cellules T d'hybridome sur des surfaces revêtues de complexes CMH/peptide

Figure 29 : Adhésion dose-dépendante, peptide-spécifique de l'hybridome 9.4 sur des plaques de dKd-Cw3

- 25 Figure 30 : Inhibition partielle de l'adhésion médiée par dKd-Cw3 de l'hybridome 9.4, par des inhibiteurs de protéine kinase

Figure 31 : Purification sélective des cellules d'hybridome 9.4 par des complexes dimérisés CMH/peptide appliqués en revêtement

5 Figure 32 : enrichissement sélectif de cellules T naïves V88 +, CD8+, spécifiques vis-à-vis de complexes Kd-HA

Figure 33 : Induction de la prolifération de cellules CD8 + purifiées par des complexes SC-Kd/HA utilisés en revêtement.

10 Figure 34 : Réponses prolifératives de cellules CD8+, dépendantes de stimulus SC-Kd/HA, ne nécessitant pas d'interaction CD28/B7.

Figure 35 : Présence d'un phénotype activé sur les splénocytes CD8+ après stimulation par SC-Kd/HA

Figure 36 : Réponse proliférative à SC-Kd/HA proportionnelle au nombre de splénocytes CD8+.

15 Figure 37 : Obtention d'une réponse cytotoxique avec des splénocytes CD8+ activés par SC-Kd/HLA.

DESCRIPTION DES MODES DE RÉALISATION PRÉFÉRÉS

Exemple 1 : Détection, obtention purification de cellules T antigène-spécifiques- Stimulation de cellules T

On prépare par ingénierie des molécules
5 monocaténares solubles HLA-A2.1 humaines (sSC-A2) en
reliant les trois premiers domaines de la chaîne lourde
A2.1 à la B2-microglobuline humaine par l'intermédiaire
d'un espaceur de 15 acides aminés, et on les transfecte
dans des cellules basophiles de rat (RBL-2H3). On purifie
10 le sSC-A2 sécrété dans le milieu de culture par
chromatographie d'affinité, à l'aide de l'anticorps
monoclonal W6.32 anti-HLA-A.B.C, présentant des fonctions
biologiques. Les molécules de sSC-A2 purifiées se lient
spécifiquement à des peptides antigéniques restreints par
15 A2. Les complexes peptidiques sSC-A2.1 interagissent avec
le récepteur de lymphocytes T approprié et provoquent une
réponse proliférative des lymphocytes T cytotoxiques
spécifiques d'un peptide. En outre, on applique avec une
densité élevée des complexes sSC-A2 chargés en peptide
20 sur des billes et on les utilise en tant que cellules
artificielles présentatrices d'antigène pour obtenir des
CTL peptide-spécifiques à partir de cellules naïves PBL
HLA-A2.1 de donneurs sains. Ces complexes s'avèrent des
stimulateurs très efficaces et induisent des CTL peptide-
25 spécifiques présentant une puissante aptitude à tuer,
restreinte par HLA-A2.1, des cellules activées par
antigène. De plus, le récepteur de cellules T de CTL
peptide-spécifiques induits utilise les mêmes, en tant
que CTL peptide-spécifiques issus d'une immunisation in
30 vivo. L'évidence que l'on constate ici indique l'utilité
des molécules modifiées du CMH au niveau fonctionnel,
c'est-à-dire des molécules sSC-A2, dans : i) des tests de

liaison peptidique destinés à identifier des peptides immunogéniques, basés sur la sélection de liants du CMH de grande affinité à partir d'antigènes connus associés à une tumeur, ii) l'induction primaire in vitro de CTL capables de tuer des cellules tumorales, permettant ainsi une analyse détaillée du répertoire de CTL humains primaires, ou la production de cellules effectrices de CTL spécifiques pour l'immunothérapie adoptive ou la dissection des conditions cellulaires et moléculaires requises pour amorcer des CTL naïfs humains.

Expression de la construction génique de la molécule sSC-A2 issue de Cellule Basophile de Rat transfectée stable (RBL-2H3)

La construction SC-A2, qui comprend la séquence signal et les trois premiers domaines de l'ADNc de la chaîne lourde de HLA-A2.1, fusionnée à la séquence codante de la B2-microglobuline humaine par l'intermédiaire d'un linker flexible de 15 acides aminés, est représentée à la figure 16. Cette construction est clonée dans le vecteur d'expression de mammifère pRc/CMV, sous le contrôle du promoteur du gène précoce immédiat du cytomégalovirus humain, et ensuite, transfectée dans des cellules RBL-2H3. Des transfectants stables sont sélectionnés pour leur résistance à l'antibiotique G418. Les clones résistants sont triés par PCR pour la construction génique intégrée. On analyse la production de molécules sSC-A2 par les clones présentant un nombre élevé de copies de gènes intégrés. On poursuit la sélection en sélectionnant les clones produisant environ 500 mg de molécules sSC-A2 par litre de surnageant de culture.

La molécule SC-A2 purifiée présente une conformation correcte

sSC-A2 secrété dans le milieu de culture est purifié par chromatographie d'immunoaffinité, en utilisant l'AcM W6/32 anti-HLA-A.B.C, et il est caractérisé par la résonance plasmonique de surface, en utilisant les AcM BB7.2 (anti-HLA-A2, -A69) et B2C16.2 (anti-B2-microglobuline humaine). Les résultats présentés à la figure 17 montrent que la molécule purifiée présente les deux déterminants sérologiques que sont HLA-A2 et celui dérivé de la B2-microglobuline humaine. Afin de s'assurer que les molécules sSC-A2 présentent une conformation correcte, on soumet un panel de sept anticorps à un test ELISA sur sSC-A2 purifié. Ce panel comprend 5 AcM HLA-spécifiques, à savoir W6/32 (anti-HLA monomorphique), BB7.2 (anti-HLA-A2, -A69), 5H7 (anti-HLA-A2, 3^{ème} domaine), PA2.1 (anti-HLA-A2) et deux AcM spécifiques de la B2-m humaine, B2C16.2 et BBM.1. Tous les AcM testés réagissent seuls ou dans des tests sandwich (anti-HLA-A2/anti-B2-microglobuline humaine) avec la molécule recombinante, démontrant ainsi que sSC-A2 recombinant est replié correctement.

Liaison spécifique de peptides synthétiques à des molécules sSC-A2 purifiées

Pour savoir si des molécules sSC-A2 peuvent se lier à des peptides restreints par HLA-A2, on utilise un peptide synthétique dérivé du virus de l'hépatite B (HBV)(FLPSDYFPSV=F10V)(81), qui est connu pour se lier à HLA-A2 comme peptide de liaison standard. Ce peptide F10V est marqué avec un marqueur radioactif et sa capacité de liaison à sSC-A2 est testée. Le peptide non lié est éliminé par ultrafiltration. Le peptide radioactif

associé à sSC-A2 est mesuré comme décrit. On observe une liaison significative (figure 18a). De plus, lorsqu'on utilise un panel de peptides synthétiques en excès en tant que compétiteurs, la liaison du peptide à marqueur radioactif est inhibée par trois peptides restreints par HLA-A2 (F10V, I9V, A9V), mais n'est pas inhibée par deux peptides restreints par H.2K^b (R8L OVA) ou deux peptides restreints par H.2K^d (CW3 Y8I) (figure 18b). Pris ensemble, ces résultats indiquent que la molécule sSC-A2 recombinante se lie à des peptides synthétiques et présente la même spécificité que la surface de la cellule native associée à la molécule HLA-A2.

Des complexes sSC-A2/peptide peuvent activer spécifiquement des cellules CTL apparentées

Ensuite, on évalue l'aptitude de la molécule sSC-A2 recombinante à agir en tant que molécule présentatrice d'antigène. On charge sSC-A2 purifié avec un peptide NA17-A (un peptide situé dans un intron du gène codant pour la N-acétylglucoseaminyltransférase V, exprimée dans la lignée cellulaire tumorale NA17-MEL issue de mélanomes métastatiques de patients NA17) (82). On utilise ensuite ces complexes sSC-A2/NA17-A sous leur forme monomère ou dimère (la dimérisation est réalisée par incubation de sSC-A2/NA17-A avec l'AcM spécifique BBM.1 anti-b2-m humaine, dans un rapport de 2/1) et on teste leur capacité à stimuler un clone de CTL restreint par HLA-A2 (CTL NA17-221) spécifique du peptide NA17-A (82). On mesure la stimulation spécifique par incorporation directe de ³H-thymidine par les CTL NA17 221 (figure 19a) ou par sécrétion de IL-2 (figure 19b). Dans les deux tests, la réponse proliférative est peptide-spécifique, étant donné que sSC-A2 chargé avec un peptide non apparenté (MAGE 3) (83) ne présente pas d'activité. Ces

résultats indiquent que la réponse spécifique peut être la conséquence de l'interaction directe des complexes SSC-A2/peptide et du récepteur de CTL approprié.

5 **Induction in vitro de CTL peptide-spécifiques issus de donneurs naïfs**

Des études récentes ont utilisé des complexes CMH/peptide pour provoquer la réponse in vitro de CTL (84-86). On incube des cellules naïves PBL HLA-A2 de donneurs sains avec des billes revêtues de complexes de SSC-A2 chargé avec le peptide matriciel de l'influenza A M58-60 (87, 88) pendant une durée appropriée (jours). On restimule les cultures une fois avec soit les conA-blasts activés par le peptide MS 8-66, soit la forme monomère de complexes SSC-A2/M58-66 pendant une durée appropriée (jours) et ensuite, on teste leur activité cytotoxique vis-à-vis de cellules cibles T2 chargées de peptide. On observe sur les figures 20a et 20b une lyse spécifique significative. Lorsque les conA-blasts activés par le peptide MS 8-66 sont utilisés pour une troisième stimulation, on obtient une lyse CTL plus spécifique qu'avec les complexes SSC-A2/M58-66 seuls. Ces résultats suggèrent que la seule présence des complexes SSC-A2/M58-66 n'amplifie pas de façon efficace certains CTL, et que la présence de cellules de remplissage augmente le succès de la multiplication à long terme. Ainsi, dans un mode de réalisation préféré, on utilise éventuellement des conA-blasts activés par peptide en tant que cellules stimulatrices.

30 **Analyse moléculaire du répertoire du TCR V β de CTL peptide-spécifiques induits in vitro, à l'aide de billes revêtues avec une densité élevée de complexe SSC-A2/peptide**

Il a été signalé qu'après une infection par l'influenza A, on peut détecter une réponse de CTL spécifique du peptide M58-66 chez la plupart des sujets HLA-A2.1. Il est intéressant de noter que les clones de CTL M58-66-spécifiques présentent des segments de gène TCR α et β conservés (89). De plus, un rapport récent désigne le TCR VB17 comme le segment VB dominant utilisé, comme déterminé à partir des lignées de CTL M58-66-spécifiques, issues de 21 individus HLA-A2 non apparentés. La multiplication de CD8 VB17 est en corrélation avec la lyse M58-66-spécifique (90). L'analyse de séquence de 38 transcrits VB17 M58-66-spécifiques issus de 13 sujets révèle la conservation importante d'un motif arginine-sérine dans la région CDR3, ayant une longueur de 8 acides aminés. En tenant compte de ces caractéristiques particulières de la réponse immunitaire humaine naturelle à l'infection par l'influenza A, on a déterminé les conditions d'induction in vitro de CTL selon l'invention, avec des billes revêtues avec une densité élevée de complexes sSC-A2/peptide en tant qu'APC artificielles, peuvent provoquer une réponse de CTL spécifique similaire à celle observée in vivo.

On a analysé le répertoire du TCR VB en utilisant la technique d'immunoscopia très sensible (91, 92). Les répertoires de TCR VB17 et VB2 représentés sur les figures (21a et 21b) sont ceux d'une population de lymphocytes T pour laquelle l'activité lytique est présentée sur les figures (20a et 20b). L'allure des cultures témoins de PBL identiques, non stimulés, est représentée à la figure 21c. On peut noter que pour le TCR VB2, l'allure typiquement gaussienne indiquant un répertoire polyclonal est observée sur les figures 21a,

21b et 21c. Toutefois, pour le répertoire de TCR VB17, ce
profile gaussien est fortement modifié. Comme on peut le
voir sur les figures 21a et 21b, un pic principal
correspondant à un CDR3 ayant une longueur de 8 acides
5 aminés indique une expansion dominante de CTL spécifiques
qui peut être en corrélation avec la lyse M58-66-
spécifique représentée sur les figures 20a et 20b. Alors
que le répertoire de TCR VB17 pour le contrôle des PBL
présente toujours l'allure typiquement gaussienne (figure
10 21c). Ces résultats indiquent que le protocole
d'induction in vitro de l'invention peut activer des CTL
spécifiques ayant des caractéristiques très similaires à
celles des CTL induits par infection in vivo.

15 Ingénierie, préparation et utilisation de CMH modifiés par SC-Kd

On prépare par ingénierie des molécules
monocaténaires K^d murines (SC- K^d) en reliant le résidu
276 de la chaîne lourde K^d au premier résidu de la β_2 -
microglobuline par l'intermédiaire d'espaceurs de
20 différentes longueurs, et on réalise leur expression
intracellulaire dans des cellules de singe COS-1. Il
s'avère que les molécules SC- K^d marquées réagissent avec
plusieurs anticorps monoclonaux qui reconnaissent les
molécules K^d natives. On étudie SC- K^d -15 (avec un
25 espaceur de 15 résidus) de manière plus approfondie. Il
peut être purifié et on a montré qu'il reprend une
structure du type natif après traitement avec des agents
dénaturants. Le SC- K^d -15 purifié peut se lier à certains
peptides de manière qualitativement similaire à K^d .

30 **Constructions plasmidiques.** Un ADNc de K^d de
longueur totale (Lalanne, J.-L., Delarbre, C., Gachelin,
G. et Kourilsky, P., *Nucleic Acids Res.*, 1983, 11:1567)

est coupé par Hind III (au niveau du résidu 276) et fusionné en phase, par un linker codant pour Gly-Gly, à l'ADNc de β_2 -m (Daniel, F., Morello, D., LeBail, O., Chambon, P., Cayre, Y. et Kourilsky, P., *EMBO J.* 1983. 2:1061) dans lequel un site Bam HI recouvrant le premier codon Ile de β_2 -m mature a été introduit par mutagénèse dirigée sur le site. Le bloc est cloné dans un vecteur d'expression de mammifère pKC3, qui contient le promoteur SV40 et l'origine de la répllication, ce qui produit pSC-K^d-2 (représenté dans la discussion concernant les constructions géniques, figure 5A). Des linkers synthétiques de différentes longueurs sont ligaturés au site Bam HI de pSC-K^d-2 (figure 5b). Par exemple, le linker SC-K^d-15 est le :

5' GATCGGATCCGGAGGCGGTGGATCCGGTGGCGGCGGTTC 3'

(SEQ ID NO:)

3' CCTAGGCCTCCGCCACCTAGGCCACCGCCGCCAAG CTAG 5'

(SEQ ID NO:)

La digestion par Bam HI de pSC-K^d-15 et la religature produisent pSC-K^d-10. pSC-K^d-13, -17, -19 et -21 sont obtenus par clonage de linkers appropriés au site Bam HI de pSC-K^d-10. Tous les espaceurs et toutes les jonctions sont séquencés.

Transfection et immunoprécipitation. On transfecte des cellules COS-1 (environ $3,5 \times 10^6$ cellules sur des plaques de 60 mm) cultivées dans du DMEM complété avec 10 % de sérum de nouveau-né, de la pénicilline, de la streptomycine et de la L-glutamine, un jour après étalement sur les plaques, avec 0,5 ml d'un mélange de phosphate de calcium contenant 5 μ g d'ADN plasmidique purifié avec CsCl. L'efficacité des transfections est mesurée de temps en temps avec le plasmide pCH110

exprimant la β -galactosidase d'*E. coli* (Pharmacia, Uppsala, Suède). Trente-six heures après la transfection, les cellules sont radiomarquées à l'aide de méthionine [^{35}S] (45 mCi/plaque=1,67 m de Bq/plaque) pendant
5 4 heures à 37°C, puis on les lave une fois dans du PBS et on les recueille dans 1 ml de tampon de lyse (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, NP40 à 1 % p/v, BSA 10 mg/ml) contenant 20 mM d'iodoacétamide et 1 UI/ml d'aprotinine. Les lysats sont purifiés préalablement sur
10 protéine A-Sepharose pendant 1 heure à 4°C et les surnageants de culture (SN) sont incubés pendant 18 heures à 4°C avec soit 30 μl de SN de culture, soit 5 μl d'ACM purifié et protéine A-Sepharose. On lave les billes trois fois et on élue les protéines dans un tampon
15 de Laemmli avec 2-ME et on les analyse par SDS-PAGE sur des gels à 12 %. Les gels sont fixés, traités avec de l'Amplify (Amersham Int., Amersham, GB), séchés et visualisés par autoradiographie à l'aide d'une pellicule XAR à rayons X de Kodak (Rochester, NY).

20 Pour les traitements par endoglycosidase H (Endo H), on équilibre les échantillons dans SDS à 0,5 %, 2-ME 1 M, on les porte à l'ébullition pendant 2 minutes, on les fait précipiter avec de l'acide trichloracétique à 15 %, on les rince avec de l'acétone et on les remet en
25 suspension dans 50 μl de citrate de sodium 50 mM, pH 5,5, SDS à 0,1 %, 2-ME 20 mM. On ajoute du Endo H (Boehringer Mannheim, Mannheim, RFA) jusqu'à une concentration finale de 150 mU/ml, on incube les échantillons à 37°C pendant 24 heures et ensuite, on les analyse par SDS-PAGE.

30 *Purification par immunoaffinité de la protéine SC-K^d-15.* On transfecte des cellules COS-1 (généralement 10^7 cellules) par l'ADN du pSC-K^d-15, on les marque et les lyse comme ci-dessus. On purifie préalablement les SN

avec de la protéine A-Sepharose pendant 1 heure à 4°C avec 100 µl d'AcM 34.1.2 lié par covalence à des billes de protéine A. Après le lavage final dans du PBS, on élue SC-K^d-15 de la matrice avec un volume égal de thiocyanate 3 M pendant 10 minutes sur de la glace. Après dialyse jusqu'au lendemain dans du PBS contenant 0,1 % de NP40, 0,05 % de Tween et 0,2 % de BSA, on utilise SC-K^d-15 dans le test de liaison direct comme ci-dessous. Sa pureté est évaluée par SDS-PAGE.

Peptides et Tests de Liaisons Peptidiques. Les peptides utilisés dans cette étude sont décrits par Choppin et al. (Choppin, J., Martinon, F., Gomard, E., Bahraoui E., Connan F., Bouillot, F. et Levy, J.P., *J. Exp. Med.*, 1990, 172:889 et les références qui y sont mentionnées), sauf pour HLA-Cw3 et HLA-A24, décrits par Maryanski, J.Ll., Pala, P., Cerottini, J.-C. et Corradin, G., *J. Exp. Med.*, 1988, 167:1391. Les tests de liaison sont effectués comme décrit par Choppin, J., Martinon, F., Gomard, E., Bahraoui E., Connan F., Bouillot, F. et Levy, J.P., dans *J. Exp. Med.*, 1990, 172:889. Les molécules de DR3, Drwl3 et K^d sont également purifiées et iodées comme décrit par Choppin, J., Martinon, F., Gomard, E., Bahraoui E., Connan F., Bouillot, F. et Levy, J.P., dans *J. Exp. Med.*, 1990, 172:889.

Constructions géniques. La partie C-terminale de la chaîne lourde K^d tronquée dans la région charnière est accrochée à la partie N-terminale de la β₂-microglobuline avec un espaceur approprié. A partir de la structure 3-D de K^d (Prochnicka-Chalufour, J.-L., Casanova, J.-L., Kourilsky, P. et Claverie, J.-M., *Res. Immunol.*, 1989, 140:133) dont le modèle est la structure HLA-A2, de Bjorkmann et al. (Bjorkmann, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennet, W.S., Strominger, J.L. et Wiley, D.C.,

Nature, 1987. 329:506), la longueur minimale d'un espaceur de type polyglycine est estimée à 11 résidus, partant du résidu 276 dans la séquence d'acides aminés K^d (qui permet d'utiliser un site de restriction approprié dans l'ADNc de K^d).

On relie deux clones d'ADNc de longueur totale codant pour K^d (Lalanne, J.-L., Delarbe, C., Gachelin, G. et Kourilsky, P., *Nucleic Acids Res.*, 1983. 11:1567) et de la b2-microglobuline (Daniel, F., Morello, D., LeBail, O., Chambon, P., Cayre, Y. et Kourilsky, P., *EMBO J.* 1983. 2:1061) par des oligonucléotides de synthèse codant pour les espaceurs. Ces derniers ont été conçus sous forme de plusieurs motifs répétitifs de glycine et de sérine (voir la section Constructions Plasmidiques). On obtient ainsi une série d'ADNc codant pour pSC-K^d avec des espaceurs de 2, 10, 13, 15, 17, 19 et 21 résidus d'acides aminés. Les séquences vérifiées sont représentées à la figure 5 de la demande US en cours d'examen n° de série 07/801 818.

Expression de SC-K^d dans des cellules COS-1 de singe transfectées. On transfecte temporairement des cellules COS-1 (dans lesquelles les plasmides recombinants peuvent se répliquer) pendant 36 heures et on les marque avec de la ³⁵S méthionine pendant 4 heures. Les molécules de SC-K^d ne sont pas détectables directement par électrophorèse du SN ou d'extraits cellulaires. Pour l'immunoprécipitation, on peut utiliser l'ACM 34-1-2 (Ozato, L., Mayer, N. et Sachs, D.H., *Transplantation*, 1982. 34:113), qui réagit avec K^d et D^d natifs.

Le SN contient 20-50 fois moins de matériel immunoprécipitable que les extraits cellulaires. Ce fait n'est pas inattendu, étant donné que la chaîne lourde K^d

tronquée au niveau du site Hind III n'est pas secrétée par les cellules COS-1 (Chambon, P., Thèse de D.E.A., Université de Paris, 1987). Dans les extraits cellulaires, des bandes correspondant à des protéines ayant une masse moléculaire apparente d'environ 52 kDa sont précipitées spécifiquement, et leur mobilité décroît légèrement lorsque la longueur de l'espaceur augmente (les figures 6A-D se référant à cela et la page suivante de la demande US en cours d'examen n° de série 07/801 818, SC-K^d-2, -10, -13, -17, -19, -21 ; pour SC-K^d-15, voir figure 6B). On n'observe pas de bande avec des cellules transfectées à blanc et 34-1-2 (figure 6A, pistes NT et pKC), ni avec des cellules transfectées et un anticorps non pertinent (F23, 1 ; figure 6B). Après les résultats de Townsend et al. (Townsend, A., Ohlen, C., Bastin, J., Ljunggren, H.-G., Foster, L. et Karre, K., *Nature*, 1989. 340:443) avec la lignée cellulaire mutante RMA-S, on a étudié l'addition de grandes quantités de peptide immunogénique (influenza NPR) qui s'est avéré sans effet (figures 6A et 6B). Dans la plus grande partie du travail ci-après, SC-K^d-15 a été choisi arbitrairement comme le prototype de la molécule SC-K^d.

Dans des études séparées utilisant des vecteurs baculovirus, on a vérifié que 34-1-2 réagit de façon très médiocre avec la chaîne lourde K^d, exprimée dans des cellules d'insectes en l'absence de β_2 -microglobuline murine (environ 20 à 50 fois moins que K^d associé à la β_2 -micro-globuline). La réactivité avec 34-1-2 constitue donc une forte indication de ce que la chaîne lourde K^d est associée correctement à la β_2 -micro-globuline. Afin de tester d'autres parties de la molécule de K^d, on a utilisé d'autres ACM K^d-spécifiques, 97-G et 20-8-4 (Ozato, L., Mayer, N. et Sachs, D.H., *Transplantation*,

1982. 34:113 et Rebai, N., Mercier, P., Kristensen, T., Devaux, C., Malissen, B., Mawas, C. et Pierres, M., *Immunogenetics*, 1983. 17:57) et on a obtenu des résultats identiques. A titre d'exemple, on a représenté à la figure 6B les bandes de SC-K^d-2 et SC-K^d-15 précipitées par l'AcM 20-8-4. La spécificité exacte de 97-G n'est pas connue, mais il s'est avéré que l'épitope reconnu par 20-8-4 comprend les résidus 82 et 89 appartenant au premier domaine de K^d (Abastado, J.-P., Jaulin, C., Schutze, M.-P., Langlade-Demoyen, P., Plata, F., Ozato, K. et Kourilsky, P., *J. Exp. Med.*, 1987. 166:327). Ainsi, cet épitope est replié correctement dans SC-K^d-2 et SC-K^d-15 ; ainsi que dans d'autres molécules SC-K^d.

Le stade de glycosylation de SC-K^d-15 intracellulaire est testé par traitement avec Endo H. La molécule se révèle complètement sensible à End H (figure 6C) et, après traitement, sa masse moléculaire apparente est d'environ 45 kDa, ce qui correspond à la masse moléculaire attendue pour SC-K^d-15 non glycosylé, sans son peptide signal (390 acides aminés). Ces résultats suggèrent que la plupart des molécules SC-K^d-15 se trouvent dans le réticulum endoplasmique sous la forme mannose supérieur.

Pour les trois AcM, la bande de SC-K^d-2 précipité est toujours 5-10 fois moins intense que celle obtenue avec les molécules de SC-K^d comprenant des espaceurs plus longs. Toutefois, l'espaceur Gly-Gly n'est pas susceptible de permettre une association correcte de la β_2 -microglobuline avec la chaîne lourde. Une bande de 12 kDa, probablement la β_2 -microglobuline de singe, est co-précipitée en des quantités relativement plus élevées avec SC-K^d-2 qu'avec d'autres SC-K^d (figure 6D). Cela suggère que la β_2 -microglobuline de singe pourrait mieux

s'associer à SC-K^d-2 qu'à d'autres SC-K^d où l'espaceur plus long permet le repliement correct de la β_2 -microglobuline murine sur la chaîne lourde K^d, ce qui pourrait expliquer la détection de certaines molécules de SC-K^d-2. De toute façon, la β_2 -microglobuline de singe ne joue pas un rôle obligatoire dans le repliement de SC-K^d-15, étant donné qu'il est possible de produire du SC-K^d-15 immunoprécipitable dans des cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant.

Purification et liaison peptidique. La réactivité de molécules de SC-K^d vis-à-vis de trois AcM distincts fournit l'évidence de leur caractère de type naïf. Néanmoins, la purification de ces molécules est nécessaire, afin de vérifier leur aptitude à se replier après des traitements qui séparent la chaîne lourde de β_2 -m, et enfin, pour voir si elles sont capables de se lier à des peptides.

Une matrice en phase solide, constituée par du 34-1-2 couplé à des billes de protéine A, est utilisée pour purifier des SC-K^d-15 marqués par ³⁵S à partir de lysats de cellules COS-1 transfectées de manière transitoire. Le traitement avec du thiocyanate de sodium 3M élue la protéine avec un rendement raisonnable (environ 70 %) comme le confirme une seconde immunoprécipitation avec 34-1-2. Après électrophorèse, le matériel purifié se présente comme une simple bande de 52 kDa. Cela confirme que la réactivité avec 34-1-2 peut être récupérée en l'absence de β_2 -microglobuline de singe détectable. Ce traitement de dilution devrait normalement dissocier la chaîne lourde de la β_2 -microglobuline (Elliott, T. et Eisen, H.N., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1990. 87:5213). De l'urée 6M est également utilisée avec des résultats similaires (non représenté).

Des molécules K^d isolées à partir de la rate de souris BALB/c sont ensuite purifiées et iodées. Elles sont purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne d'AcM 20-8-4 et on compare la liaison de peptides à cette dernière et à SC- K^d -15 marqué par ^{35}S dans le test de Bouillot et al. (Bouillot, M., Choppin, F., Papo, T., Gomard, E., Fournie-Zaluski, M.-C. et Levey, J.-P., Nature 1989. 339:473 et Choppin, J., Martinon, F., Gomard, E., Bahraoui, E., Connan, F., Bouillot, F. et Levy, J.-P., J. Exp. Med., 1990. 172:889).

Deux peptides parmi les protéines virales de VIH (env 312-327 et vpr 68-80), connus pour se lier fortement à plusieurs molécules de CMH (Choppin, J., Martinon, F., Gomard, E., Bahraoui, E., Connan, F., Bouillot, F. et Levy, J.-P., J. Exp. Med., 1990. 172:889), se lient dans une mesure significative à SC- K^d -15 aussi bien qu'au témoin positif HLA-DR3 ou DR213 (tableau 10 ; résultats présentés en double). Dans une expérience séparée, on compare la liaison de SC- K^d -15 à celle du K^d classique (tableau 10). Comme ci-dessus, le peptide env 312-327 se lie aux deux molécules, mais trois peptides connus pour être immunogéniques (HLA-A24 170-182, HLA-Cw3 170-182 et influenza NPR-147-158 ; (Maryanski, J.L., Pala, P., Cerottini, J.-C. et Corradin, G., J. Exp. Med., 1988. 167:1391 et Bodmer, H.C., Pemberton, R.M., Rothbard, J.B., Askonas, B.A., Cell, 1989. 52:253), ne présentent pas de liaison détectable, ni à SC- K^d ni aux molécules de K^d . Dans une expérience de compétition où le peptide env 312-327 est lié à une matière plastique, on voit que le peptide vpr 68-80 est un compétiteur efficace, tandis que le peptide Cw3 170-182 (qui ne se lie pas dans l'essai direct) ne l'est pas. En résumé, SC- K^d -15 se lie aux peptides de VIH env 312-327 et vpr 68-80 dans une

proportion significative, bien que de manière quelque peu moins efficace que K^d classique (mais les conditions optimales peuvent être différentes pour K^d et pour SC- K^d -15 et on n'a pas fait d'efforts pour optimiser la liaison à SC- K^d -15 à ce stade).

Il n'y a pas de liaison détectable de trois peptides immunogéniques ni à SC- K^d -15, ni à K^d . Il est possible que ces peptides se lient de façon bien moins efficace que les deux peptides de VIH décrits plus haut, et que le test, tel que réalisé, n'est pas suffisamment sensible pour détecter la liaison. Des observations similaires ont déjà été faites (Choppin, J., Martinon, F., Gomard, E., Bahraoui, E., Connan, F., Bouillot, F. et Levy, J.-P., J. Exp. Med., 1990. 172:889).

En conclusion, n'ignorant pas les difficultés associées à l'interprétation de telles expériences de liaison peptidique, cet exemple démontre que le comportement de SC- K^d -15 est qualitativement similaire à celui du K^d classique. SC- K^d -15 est capable de se lier à des peptides de manière similaire à celle de K^d .

En conclusion, cet exemple démontre que l'ingénierie de molécules K^d monocaténaires qui présentent les propriétés attendues en ce qui concerne (a) la réactivité avec trois AcM, dont l'un repère l'association correcte avec la β_2 -microglobuline et un autre, un épitope appartenant au premier domaine, (b) un reploiement efficace par traitement avec du thiocyanate de sodium 3M ou de l'urée 6M, et (c) liaison de certains peptides. Au-dessus de 10 résidus environ, la longueur de l'espaceur entre la chaîne lourde de K^d et la β_2 -microglobuline murine ne semble pas décisive. Toutes les expériences décrites ont été réalisées avec des quantités

infinitésimales de molécules SC-K^d marquées de façon métabolitique. La production en grandes quantités devrait conduire à un matériel utilisable pour des études sur la liaison de peptides et de TcR.

Tableau 10 Liaison de peptides à des molécules CMH purifiées ¹

	SC-K ^d marqué par ³⁵ S	HLA-DR3/DRw13 marqué par ¹²⁵ I
(A) Quantité mise en oeuvre (cpm)	10,000	200000/200000
nef 66-80	475	2325/1388
(30 µg/ml; pH 9.6)	397	1822/1290
env 312-327	750	6782/19957
(30 µg/ml; pH 9.6)	712	3778/22637
vpr 68-80	710	18582/21838
(10 µg/ml; pH 5)	621	18245/20593

¹ Expériences réalisées en double.

	SC - K ^d marqué par ³⁵ S	H-2K marqué par ¹²⁵ I
<hr/>		
(B)		
Quantité mise en oeuvre		
(cpm)	6000	100000
Pas de peptide appliqué	228	1471
en revêtement	223	1595
A24 170-182	284	1060
(10 µg/ml; pH 9.6)	229	1302
Cw3 170-182	169	1340
(10 µg/ml; pH 9.6)	117	1384
NPR 147-158	214	1257
(10 µg/ml; pH 9.6)	171	1259
env 312-327	390	13772
(5 µg/ml; pH 9.6)	377	13764
env 312-327	42	359
+vpr 68-80	41	409
env 312-327	367	15378
+ Cw3 170-182	375	15835

Sc-K^d en tant que molécule présentatrice d'antigène. Comme ce sera discuté ci-après de manière plus approfondie, les expériences réalisées dans le laboratoire des inventeurs ont montré qu'une molécule H-2K^d soluble, monocaténaire, recombinante, du CMH de classe I, est capable d'agir en tant que molécule présentatrice d'antigène, stimulant ainsi un hybridome restreint par H-2K^d restreint pour l'antigène. Ces résultats seront discutés ci-après, après un résumé des matériels et méthodes utilisés dans les expériences.

On a construit une molécule H-2K^d soluble, monocaténaire du CMH de classe I (SC-2K^d) en reliant la terminaison C de l'ectodomaine de la molécule native H-2K^d à la terminaison N de la β 2-microglobuline murine par l'intermédiaire d'un espaceur ayant une longueur de 15 acides aminés [Mottez, 1991]. Contrairement aux molécules natives du CMH, purifiées à partir de cellules, cette molécule chimérique est soluble en l'absence de détergent et elle est homogène par rapport à la β 2-microglobuline d'origine murine. Elle est produite en grandes quantités en utilisant des cellules d'insectes infectées par baculovirus, des levures ou des cellules ovariennes d'hamster chinois et elle se lie à des peptides synthétiques avec la même spécificité que H-2K^d natif, associé à la surface cellulaire [Godeau, 1992 ; Ojcius, 1993 ; Abastado, 1993].

Nous démontrons que cette molécule H-2K^d recombinante monocaténaire est capable d'activer spécifiquement un hybridome de lymphocyte T et un basophile de rat transfecté par son TCR apparenté. De plus, on a montré que si SC-K^d monovalent se lie à la cellule d'hybridome T, la dimérisation de SC-K^d est nécessaire pour transmettre le signal d'activation.

Ainsi, les déterminants modifiés du CMH ou les complexes CMH/peptide selon l'invention peuvent être utilisés sous forme dimérisée. Des méthodes de dimérisation seront décrites plus loin et sont évidentes pour l'homme du métier.

L'hybridome de lymphocyte T 9.4 est obtenu par fusion entre les 58 hybridomes de lymphocyte α - β -T [Letourneur, 1989] et le clone de CTL CW3/1.1 [Maryanski, 1986] spécifique du peptide Cw3 présenté par H-2K^d. Les peptides Cw3, NP et PbCS ont été décrits antérieurement [Maryanski, 1991].

Les anticorps monoclonaux SF1-1.1.1 (ATCC HB159), 20-8-4 [Abastado, 1987], F23.1, H57 ont été décrits antérieurement et sont spécifiques de H-2K^d, H-2K^d, les domaines VB8* et CB du TcR, respectivement. Des fragments Fab et F(ab')₂ sont préparés comme décrit par Harlow, 1988. La lignée cellulaire basophile RBL-2H3 est transfectée comme décrit par Engel et al., 1992. La sécrétion d'IL2 dans le surnageant est mesurée par sa capacité à soutenir la prolifération de la lignée cellulaire CTLL dépendante d'IL-2. La prolifération des CTLL est mesurée par incorporation de ³H-thymidine.

SC-K^d monocaténaire agit comme une molécule présentatrice d'antigène. Pour tester l'aptitude de la molécule SC-K^d recombinante à agir comme une molécule présentatrice d'antigène, on charge SC-K^d purifié avec un peptide dérivé de HLA-Cw3 (appelé ci-après Cw3), on l'étale sur une plaque de microtitrage et on teste son aptitude à stimuler un hybridome restreint par H-2K^d spécifique du peptide Cw3. On observe une stimulation spécifique détectée par la sécrétion d'IL2 dans le milieu de culture. Cette activation est spécifique du peptide,

étant donné que SC-K^d chargé avec un peptide non apparenté (PbCS) ne présente pas d'activité.

Pour agir comme une molécule présentatrice d'antigène, SC-K^d doit être au moins dimère. De
5 nombreuses études in vitro, utilisant des anticorps anti-TcR en tant que stimulateurs de lymphocytes T, indiquent qu'une liaison croisée du TcR est nécessaire pour l'activation des lymphocytes T [Kolanus, 1993 #690]. Toutefois, il n'est pas clairement élucidé si et comment
10 l'agrégation des TcR se produit dans des conditions plus physiologiques, en particulier quand les TcR reconnaissent les complexes CMH/peptide. Le fait que des milliers de peptides différents soient présentés par le même APC [Engelhard, 1994] semble exclure la formation de
15 plages étendues et stables de TcR réticulés. D'autres modèles ont été proposés où le contact entre les TcR et les complexes CMH/peptide provoque une transformation conformationnelle chez les TcR, qui à leur tour transmettent le signal à l'intérieur de la cellule
20 (discuté chez Karjalainen, 1994). Dans les expériences précédentes, on a étalé sur des plaques du SC-K^d recombinant, imitant ainsi la surface cellulaire présentatrice d'antigène.

La disponibilité de molécules monomères solubles du
25 CMH permet de tester les conditions de multivalence nécessaires pour que la molécule du CMH puisse activer les hybridomes de lymphocytes T. On transforme SC-K^d monovalent monocaténaire, chargé avec le peptide Cw3, en dimère par incubation avec un anticorps monoclonal
30 spécifique de H-2K^d (SF1-1.1.1), reconnaissant un épitope dans le domaine α_3 . On ajoute ensuite cette préparation aux lymphocytes T et on mesure l'activation par la sécrétion d'IL2. Les SC-K^d dimères sont capables de

stimuler les hybridomes de lymphocytes T 9.4 de manière dépendante de la dose. Cet effet est spécifique du peptide, étant donné que des dimères formés à partir de molécules de SC-K^d chargées avec des peptides non apparentés (PbCS ou T9V) ne stimulent pas les lymphocytes T.

Lorsqu'on omet l'anticorps spécifique de K^d, lorsqu'on le remplace par l'anticorps 20-8-4S reconnaissant un épitope dans le domaine α_1 - α_2 de Kd [Abastado, 1987 #519] ou lorsqu'on utilise un anticorps non apparenté du même isotype (F23.1), on n'observe pas de stimulation. De plus, lorsqu'on utilise un excès de l'anticorps anti- α_1 - α_2 (20-8-4S) en plus de l'anticorps anti- α_3 (SF1-1.1.1), la stimulation des lymphocytes T est perdue, un excès de l'anticorps non apparenté n'ayant pas d'effet.

Afin de prouver encore que la dimérisation est nécessaire pour l'activation des hybridomes de lymphocytes T dans ce cas, on incube des complexes SC-K^d/Cw3 avec des fragments Fab ou F(ab')₂, préparés à partir de l'AcM SF1-1.1.1, avant l'addition aux cellules hybridomes 9.4. Alors que les fragments Fab n'ont pas d'effet, les fragments F(ab')₂ sont aussi efficaces que l'immunoglobuline native pour stimuler l'hybridome de lymphocyte T.

Dans ce cas, la dimérisation des molécules CMH est nécessaire pour la transmission de signal, et non pour la liaison. Deux études indiquent que l'affinité de TcR pour son complexe CMH/peptide apparenté est très faible, $KD=10^{-4}$ à 10^{-5} M [Weber, 1992 ; Matsui, 1991]. Etant donné que la concentration utilisée dans le test est d'environ 10^{-7} , on pourrait objecter que l'anticorps

anti-K^d est nécessaire pour stimuler l'hybridome de lymphocyte T, parce que la dimérisation augmente l'avidité apparente du complexe pour le TcR.

Pour étayer cette interprétation, on a élaboré l'expérience suivante. On profite du taux de dissociation lente de l'AcM SF1-1.1.1. Par conséquent, une fois que les complexes K^d-peptide se sont liés à cet AcM, ils se dissocient très lentement. Des molécules SC-K^d sont chargées soit avec le peptide Cw3, soit avec le peptide PcCS non apparenté (non stimulateur). Tout en maintenant la concentration de SC-K^d/Cw3 constante, on ajoute des concentrations croissantes de SC-K^d/PbCS et d'AcM SF1-1.1.1 aux cellules d'hybridome 9.4. Dans un cas, on mélange d'abord les complexes SC-K^d/peptide avec l'AcM SF1-1.1.1 et ensuite, on les ajoute à celles d'hybridome T. Dans l'autre cas, on les incube d'abord avec les hybridomes de lymphocytes T et ensuite, on ajoute l'AcM SF1-1.1.1. Dans le premier cas, l'augmentation de la concentration de SC-K^d/PbCS conduit à une perte progressive de l'activation des lymphocytes T. La perte de l'activation des lymphocytes T résulte probablement d'une diminution du nombre d'homodimères de SC-K^d/Cw3. Après 3 heures, on élimine SC-K^d non lié par lavage précautionneux, mais approfondi. On ajoute ensuite l'anticorps SF1-1.1.1 et on mesure la réponse des lymphocytes T après une incubation supplémentaire de 16 heures. Comme représenté à la figure 5, même lorsque l'anticorps K^d-spécifique est ajouté après élimination de SC-K^d non lié, les cellules répondent par sécrétion d'IL2 dans le milieu de culture. Cela indique que la dimérisation de SC-K^d est nécessaire pour l'action des lymphocytes T, et non pour la liaison de TcR.

Des molécules monocaténaires SC-K^d activent des cellules RBL basophiles de rat, transfectées avec des fusions TcR- ζ . Etant donné que l'affinité des TcR pour les CMH est assez faible, il a été suggéré que des

5 molécules accessoires sont nécessaires pour stabiliser l'interaction. Eventuellement, de telles molécules pourraient aider les lymphocytes T à rechercher des cellules présentatrices d'antigène de type approprié, à

10 établir le conjugué de cellule primaire et ensuite, le complexe CMH/peptide pourrait transmettre le signal d'activation par l'intermédiaire du TcR. Tout un réseau de molécules exprimées à la surface à la fois des APC et des lymphocytes T est ainsi impliqué.

Le fait d'utiliser des molécules du CMH purifiées a

15 permis aux inventeurs de démontrer que les dimères SC-K^d chargés avec un peptide spécifique entrent en interaction avec les TcR en l'absence de molécules accessoires ou co-récepteurs. Bien que l'on utilise des molécules CMH solubles purifiées, il n'est pas possible de démontrer

20 complètement l'implication de molécules accessoires dans l'activation de l'hybridome de lymphocytes T 9.4. En particulier, des molécules CD8 peuvent se lier à la molécule monocaténaire soluble et augmenter l'avidité apparente du complexe de CMH pour l'hybridome de

25 lymphocytes T. Engel (1992) a développé récemment un système cellulaire dans lequel l'interaction de CMH/peptide avec TCR peut être mesurée en l'absence de molécules accessoires.

Les ectodomains (V+C) des chaînes α et β des TcR

30 exprimés par le clone de CTL CW3.1/1 sont fusionnés par PCR à la transmembrane et aux domaines cytoplasmiques de la chaîne ζ de CD3. Les constructions obtenues sont transfectées dans la lignée cellulaire basophile de rat

RBL-2H3 et les transfectants sont analysés par cytométrie de flux à l'aide d'anticorps H57 anti-V β ₁₀. Comme représenté à la figure 6, on détecte des niveaux élevés d'expression à la surface cellulaire.

5 Ce transfectant est utilisé pour tester la capacité de SC-K^d monocaténaire soluble à présenter le peptide Cw3 et à induire l'activation cellulaire telle que mesurée par exocytose de sérotonine. Comme représenté à la figure 7, alors que SC-K^d seul chargé avec Cw3 ne produit pas d'effet, SC-K^d chargé avec Cw3 et complexé avec
10 l'anticorps SF1-1.1.1 anti- α ₃ anti-Kd active spécifiquement les transfectants RBL-2H3. Cette activation est peptide-spécifique puisque SC-K^d chargé avec un peptide non apparenté ne produit pas d'effet.
15 Etant donné que la lignée cellulaire RBL-2H3 basophile de rat n'exprime pas CD4 ou CD8, ce résultat démontre que la réticulation provoquée par SC-K^d de la molécule chimère TCR- ζ est suffisante pour l'activation cellulaire.

20 La molécule K^d monocaténaire décrite ici est complètement fonctionnelle et peut activer une molécule présentatrice d'antigène pour stimuler des hybridomes de lymphocytes T. Ces résultats mettent en évidence l'importance de l'agrégation des TcR provoquée par l'anticorps anti-CMH. Toutefois, le basophile RBL-2H3 et
25 l'hybridome de lymphocytes T 9.4 expriment le récepteur de Fcg et on pourrait objecter que l'activation se produit par l'intermédiaire de ce récepteur, et pas seulement par l'intermédiaire des TcR. Cette hypothèse peut être exclue dans la mesure où les expériences
30 initiales ont été réalisées sur des molécules SC-K^d étalées sur des plaques, en l'absence de tout anticorps anti-CMH. De plus, lorsqu'on utilise des concentrations élevées de SC-K^d chargé avec Cw3, on observe une

agrégation spontanée. Ces préparations agrégées de SC-K^d pourraient stimuler les hybridomes de lymphocytes T en l'absence d'anticorps anti-CMH (données non représentées).

5 *Dimérisation, polymérisation ou agrégation de SC-K^d ou en général.* SC-K^d est dimérisé en utilisant le protocole suivant. On incube SC-K^d purifié (0,5 mg/ml) pendant 2 heures à 4°C avec Ab. La dimérisation peut être
10 nécessaire pour l'activation de cellules RBL transfectées par TCR. Abastado et al., J. Exp. Med. vol. 182, p. 439, août 1995, montrent que cette condition peut également s'appliquer à des hybridomes de lymphocytes T. Par conséquent, il est possible également que la dimérisation soit une pratique de routine pour réaliser la stimulation
15 in vivo des lymphocytes T. Cependant, d'autres moyens ou formes d'agrégation peuvent être tentés également. Les mêmes procédures de dimérisation ou d'agrégation, ou des procédures similaires, peuvent être suivies afin de transformer les dimères en agrégats supérieurs de
20 déterminants modifiés du CMH ou de molécules du CMH décrits dans la présente invention. Pour la dimérisation, on incube des déterminants dimérisés du CMH pendant environ une heure à environ la température ambiante avec une quantité égale d'anticorps de dimérisation, mais à
25 une concentratin d'environ 100 µg/ml ou supérieure.

Préparation de Kd et Ld solubles. Un mode de réalisation d'un déterminant modifié du CMH, qui peut être utilisé dans la présente invention, est la séquence SC-Kd de la demande US en cours d'examen n° de série
30 07/801 818, déposée le 5 décembre 1991 (décrite ci-dessus). La séquence SC-Kd est clonée dans un vecteur d'expression amplifiable pFRSV et transfectée dans des cellules ovariennes d'hamster chinois (CHO). On

sélectionne des clones résistant à du méthotrexate à 0,5 μm et on les soumet à des augmentations par paliers de la concentration de méthotrexate de 1 à 500 μm . On mesure par ELISA le Kd sécrété dans le surnageant de culture, sur des plaques de microtitrage revêtues avec SF1-1.1.1 et on révèle les plaques avec 20-8-US biotinylé et de la streptavidine marquée à la peroxydase de raifort. (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). On cultive des clones transfectants forts producteurs dans un flacon rouleur dans un milieu α -MEM complémenté avec 2 % SFV. On purifie les molécules SC-Kd par chromatographie d'affinité sur protéine A-Sepharose couplé à l'AcM SF1-1.1.1. Avant utilisation, on soumet les préparations SC-Kd à une ultracentrifugation pendant 1 heure à 200 000 g pour éliminer tout agrégat.

On charge les molécules SC-Kd avec le peptide antigénique et on le dimérise à l'aide de l'AcM SF1-1.1.1. On opère de manière à obtenir un rapport de un pour un. Dans certaines expériences, les dimères sont purifiés par filtration sur gel haute performance Superose GHR (Pharmacia LKB Biotechnology, Inc.) avec un débit de 0,135 ml par minute de PBS.

On purifie du Ld soluble par chromatographie d'affinité à l'aide de l'AcM 30-5-7 à partir du surnageant de culture de cellules de *Drosophila melanogaster* transfectées. Immédiatement après la purification, on charge des molécules SC-Kd ou Ld avec les peptides indiqués dans un rapport molaire de 1 pour 1.

Couplage de complexes CMH/peptide à des supports solides. On couple le complexe CMH/peptide ainsi obtenu à un support solide approprié. On peut utiliser des

supports tels que des flacons de culture en matière plastique ou des billes de latex. On peut également utiliser divers autres supports connus dans la technique, tels que des matrices de gel, des billes de verre, des billes revêtues de liposomes. Dans un mode de réalisation préféré, on utilise des billes magnétiques (Dynabeads M450 tosylactivés) (Dynal A.S. Oslo, Norvège). Le couplage à des billes magnétiques et à des plaques de microtitrage est décrit ici dans les deux cas, à titre d'exemple.

On couple d'abord à l'AcM SF1-1.1.1 ou 30-5-7 des Dynabeads M450 tosylactivés, en suivant les instructions du fabricant. Il est important de noter que les billes peuvent être activées de manière efficace par d'autres moyens. La limitation importante est que l'orientation du complexe CMH/peptide doit faciliter la liaison aux lymphocytes T. Les anticorps sont liés au support avant la fixation du complexe CMH/peptide afin d'augmenter la densité des complexes CMH/peptide sur les billes et favoriser l'orientation du complexe. Bien que l'on ait utilisé des anticorps, leur utilisation est indiquée à titre purement illustratif. D'autres partenaires de liaisons spécifiques, qui préservent l'efficacité de la liaison et l'orientation, sont également applicables.

En bref, on incube 150 µg d'anticorps purifié avec 15 mg (2×10^8) de billes dans 1 ml d'une solution de borate 0,25 M, pH 9,5, pendant 24 heures à 22°C. Les billes sont lavées soigneusement dans du PBS contenant 0,1 % de BSA pour éliminer l'anticorps en excès et saturer les sites libres avec BSA. On incube les billes pendant 0,5 heure à 4°C avec 150 µg de complexes CMH/peptide et on les relave dans le même tampon (généralement, on utilise un excès 100 fois supérieur du

complexe pour saturer tous les sites de fixation des anticorps). Afin de déterminer l'efficacité du couplage, les billes magnétiques couplées au SF1-1.1.1 sont incubées avec un excès de molécules SC-Kd chargées avec un peptide de type PbCS marqué avec ^{125}I , avec une activité spécifique de 2×10^{12} Bq/mmol (16). Après lavage soigné, on mesure la radioactivité associée aux billes et on l'utilise pour calculer la quantité de SC-Kd couplé.

On purifie les AcM SF1-1.1.1 anti-Kd (HB159 ; American Type Culture Collection, Rockville, MD) et les AcM 30-5-7 anti-Ld (17) sur protéine A-Sepharose à partir du surnageant de culture ou de fluide ascitique, respectivement. Des anticorps anti-VB10 conjugués à PE et anti-CD8 conjugués à FITC sont fournis par Pharmingen (San Diego, CA). Le AcM SF1-1.1.1 est spécifique pour le domaine α_3 de Kd.

Les lignées de cellules tumorales P815 (TIB64 ; American Type Culture Collection, Rockville, MD), P815-Cw3 (18), P198 (19), et la lignée de cellules hybridomes 9.4 T (20) ont été déjà décrites ailleurs. Les cellules 9.4 à croissance exponentielle sont marquées pendant 16 heures à l'aide de la [méthyl- ^3H]-thymidine (Amersham-France, Les Ulis, France) à une activité spécifique de 2×10^3 Bq par cellule.

Source de lymphocytes T. On connaît dans la technique diverses méthodes pour recueillir des lymphocytes T comprenant le lymphocyte T antigène-spécifique et on peut les utiliser. Généralement, on prélève du tissu spécifique chez des animaux que l'on sait posséder le lymphocyte T antigène-spécifique, au moyen d'une caractérisation préalable ou d'une introduction délibérée de l'antigène ou du vecteur

associé à l'antigène, ou on effectue des biopsies. Deux exemples, concernant des PEL et TIL, seront décrits ci-après.

Des lymphocytes d'exsudat péritonéal (PEL) peuvent être préparés par toute méthode connue dans la technique. Par exemple, comme dans certains des modes opératoires spécifiques décrits, on injecte par voie intrapéritonéale à des souris 10^7 cellules tumorales P815. On effectue une seconde injection 8 jours plus tard. Dix jours après la seconde injection, on recueille les cellules dans la cavité péritonéale et on les purifie sur un gradient de Percoll (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suède).

Des lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) peuvent être préparés par des méthodes connues dans la technique. Par exemple, comme dans certains des modes opératoires décrits, on injecte dans l'épaule droite de souris, par voie sous-cutanée, 3×10^6 P815 ou $1,5 \times 10^7$ P815-Cw3 ou 3×10^6 P198, comme indiqué. Lorsque les tumeurs ont atteint 1 cm, on les prélève et on purifie les cellules sur un gradient de Percoll. Dans certains essais, les TIL sont amplifiés pendant 10 jours dans du RPMI 1640 (Gibco BRL, Eragny, France) complété avec 10 % de FCS (Dutscher, Brumath, France), 10 U/ml de IL-2 et de IL-7 (Immunogenex, Los Angeles, CA) en présence d'une quantité 10 fois en excès de splénocytes syngéniques irradiés.

Purification de lymphocytes T par adsorption sur des complexes CMH/peptide. On ajoute à la suspension cellulaire des billes magnétiques couplées au complexe CMH/peptide indiqué et on incube le mélange de préférence à une température qui ne permet pas la phagocytose d'un complexe par un macrophage et qui ne nécessite pas la régulation négative de l'expression des récepteurs de

lymphocytes T. Une température pouvant provoquer le moindre dommage aux cellules peut être déterminée par expérimentation de routine. Les cellules sont séparées par voie magnétique à l'aide d'un concentrateur de particules magnétiques (Dynal) suivant les instructions du fabricant, elles sont lavées avec précaution deux fois avec du milieu de culture froid et incubées pendant 1 heure pour dissocier les billes des lymphocytes T. La température recommandée est de 37°C. Les réglages de temps et de température peuvent être ajustés de façon à obtenir des résultats optimaux par expérimentation de routine. Une incubation pendant 3 heures à 4°C s'est avérée efficace dans certains cas. Le procédé peut être rendu optimal par rotation douce afin de maximaliser le contact entre le complexe CMH/peptide et les lymphocytes T.

On peut utiliser diverses techniques pour dissocier les lymphocytes T du support. Ces techniques varient en fonction de la nature du support utilisé dans le procédé, mais généralement, elles comprennent des techniques telles que le "panning" (procédure de triage de cellules permettant leur séparation) et des techniques similaires connues. Lorsqu'on utilise des billes magnétiques ou des flacons ou plaques en matières plastique, on peut employer le panning.

Analyse du répertoire du TCR β . Le répertoire du TCR β est analysé comme décrit ici. En bref, on prépare de l'ARN total par lyse dans du thiocyanate de guanidium et ultracentrifugation sur un gradient de CsCl. On effectue la synthèse d'ADNc simple brin en utilisant le kit de synthèse d'ADNc de Boehringer Mannheim. On incube 10 μ g d'ARN total pendant 10 minutes à 70°C avec du (dT)₁₅ (5 μ M) et chaque dNTP à 1 mM. Après extraction au phénol-

chloroforme, on soumet l'ARN à une transcription inverse. On amplifie l'ADNc formé par PCR, à l'aide des amorces spécifiques VB10 et CB. Un mélange contenant KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,2), MgCl₂ 1,5 mM, 0,01 % de gélatine, dNTP 200 µM, 0,01 % de Triton X-100, l'ADNc nouvellement synthétisé (ou de l'eau dans les témoins négatifs), la Taq polymérase (Promega) (2 unités/100 µl) et 0,25 µM d'amorce CB est réparti dans 23 tubes (47 µl par tube), contenant chacun 2,5 µl d'huile minérale. L'amplification est effectuée dans un thermocycleur Perkin-Elmer ou LEP. L'amplification commence par une étape de dénaturation de 1 minute à 94°C, suivie par 40 cycles constitués par 70 secondes à 94°C, 1 minute à 60°C et 4 minutes à 72°C (pour réduire au minimum la recombinaison intra-PCR), et enfin, une étape de 10 minutes à 72°C. Les produits de la réaction d'amplification sont soumis à un allongement final (run off ou amplification par PCR) en utilisant soit un CB emboîté, soit une amorce JB1.2 spécifique, marquée par un fluorophore. On fait passer les produits amplifiés marqués sur un gel de séquençage pour déterminer la taille et l'intensité de fluorescence sur un séquenceur d'ADN 373A (Applied Biosystems). La quantification des amplifiés est simplifiée par un logiciel créé à cet effet, en particulier le logiciel Immunoscope. (4).

Adsorption spécifique d'hybridomes de lymphocytes T sur leur complexe CMH-peptide apparenté. Afin de déterminer si les lymphocytes T peuvent être purifiés spécifiquement par adsorption sur des complexes CMH-peptide, on utilise une molécule monocaténaire, recombinante, soluble du CMH de classe I, décrite précédemment (SC-Kd). SC-Kd purifié peut être chargé avec des peptides exogènes par incubation avec environ 5 µM de

peptide, les exemples comprenant Cw3 ou PbCS, pendant 1 heure à 37°C. Ces derniers peuvent être dimérisés à l'aide de l'AcM SF1-1.1.1. Les dimères peuvent être purifiés par filtration sur gel haute performance Superose 6 HR (Pharmacia LKB Biotechnology, Inc.) avec un débit de 0,35 ml/min de PBS. De tels complexes SC-Kd/peptide sont reconnus spécifiquement par les lymphocytes T apparentés (24). Le premier utilisé est l'hybridome de lymphocytes T 9.4 (20), qui est restreint pas Kd et spécifique d'un peptide dérivé de HLA-Cw3.

Les billes magnétiques sont couplées par covalence à l'AcM Kd-spécifique SF1-1.1.1 et elles sont incubées avec un excès de SC-Kd chargé soit avec le peptide Cw3, soit avec le peptide PbCS non apparenté. Dans des expériences parallèles utilisant des molécules SC-Kd chargées avec un peptide radioactif, on a déterminé que chaque bille est couplée à environ $1,3 \times 10^5$ molécules SC-Kd (non représenté). Les billes chargées avec SC-Kd/Cw3 (3×10^6) sont mélangées avec $5,5 \times 10^5$ cellules 9.4 marquées avec ^3H . Après trois lavages effectués avec précaution, on recueille les billes magnétiques et on récupère les cellules liées. On détermine le nombre de cellules en mesurant la radioactivité associée aux billes.

Comme le montre la figure 5, $62 \pm 2,8 \%$ de lymphocytes T sont récupérés par adsorption sur les complexes SC-Kd/Cw3 spécifiques. D'un autre côté, on récupère 20 fois moins de cellules ($3 \pm 0,3 \%$) avec les complexes SC-Kd/PbCS. Ce résultat indique que la liaison des lymphocytes T aux billes magnétiques est peptide-spécifique et suggère que des populations de lymphocytes T complexes peuvent être enrichies en lymphocytes T ayant une spécificité donnée.

D'une manière générale, on récupère de 60 % à 80 % de cellules spécifiques. On a calculé que plus de 10^5 complexes Kd/peptide sont liés à chaque bille. Dans une étude antérieure (39), on a extrait le peptide Cw3 à partir des cellules P815-Cw3 et on en a recueilli quelque centaines par cellule. En considérant que le diamètre d'une cellule P815 est trois fois celui d'une bille, la densité moyenne des complexes Kd/Cw3 par unité de surface est d'au moins 10^3 fois, et peut-être même 10^5 fois plus élevée sur les billes que sur les cellules P815-Cw3. Toutefois, on pourrait objecter qu'une densité élevée de complexes Kd/Cw3 pourrait être également obtenue à la surface cellulaire par redistribution d'antigène après l'interaction avec le TCR. Dans tous les cas, les résultats montrent qu'en utilisant un support solide couplé à une densité élevée de complexes CMH/peptide, on peut purifier les lymphocytes T selon leur spécificité.

Purification de lymphocytes d'exsudat péritonéal peptide-spécifiques (PEL). Pour déterminer si les lymphocytes T peptide-spécifiques peuvent être purifiés à partir de populations cellulaires complexes, on prépare des PEL de souris DBA/2 (H-2d) immunisées contre P815-Cw3, étant donné que J. Maryanski et ses collaborateurs ont montré que cette réponse immunitaire est caractérisée par une expansion excessive des lymphocytes T spécifiques. Le mastocytome P815 d'origine DBA/2 n'est pas très immunogène. Son immunogénicité peut être améliorée par transfection avec divers antigènes, tels que l'antigène du CMH de classe I humain HLA-Cw3 donnant naissance à P815-Cw3, qui est plus immunogène et par conséquent, généralement rejeté (18). La réponse immunitaire à P815-Cw3 chez des souris DBA/2 est dirigée principalement contre le peptide Cw3 présenté par H-2Kd.

De plus, lorsque ces auteurs ont analysé un panel de 23 clones de lymphocytes T indépendants, spécifiques de P815-Cw3, ils ont trouvé que tous les clones reconnaissaient le peptide Cw3 présenté par Kd et utilisaient le même segment V β (V β 10). De plus, il y avait un biais significatif (12/23) en faveur du segment J β 1.2 et toutes les régions CDR3 des chaînes β analysées avaient la même longueur (6 acides aminés). Ces caractéristiques ont également été observées lors de l'analyse directe de PBL, PEL ou TIL par cytométrie sans expansion in vitro (11). Lorsqu'on analyse par PCR le répertoire de TCR β de ces populations cellulaires, on détecte un pic caractéristique correspondant à une longueur de CDR3 de 6 résidus, en utilisant une amorce V β 10-spécifique. De plus, chez toutes les souris soumises au test, une fraction variable, mais significative, de ces transcrits V β 10 utilise le segment J β 1.2 (observations non publiées JPL et figure 7). Ces caractéristiques nous ont permis de détecter des lymphocytes T spécifiques et de régler l'enrichissement en lymphocytes T spécifiques par adsorption de complexes CMH/peptide.

Des PEL de souris DBA/2 immunisées avec P815-Cw3 sont adsorbés sur des billes couplées à SC-Kd/Cw3, lavés et analysés par cytométrie de flux. La figure 6 représente l'allure de l'expression de V β 10 par des PEL avant et après adsorption sur des complexes SC-Kd/Cw3. Avant adsorption, on observe une distribution bimodale, tandis qu'après adsorption, la population cellulaire est homogène exclusivement dans les cellules exprimant V β 10. Les PEL sont également caractérisés avant et après adsorption en utilisant d'autres marqueurs de la surface cellulaire. Le nombre et le pourcentage des différents

sous-ensembles cellulaires sont indiqués dans le Tableau 1. Les lymphocytes T exprimant CD8+, V β 10 représentent 20,4 % de la population initiale qui est essentiellement composée de cellules non-T (P815-Cw3 résiduels, macrophages et lymphocytes B). Toutefois, dans les PEL adsorbés, les lymphocytes T exprimant CD8+V β 10 représentent 97 % de la totalité des cellules, ce qui correspond à un enrichissement d'un facteur de cinq. Le nombre absolu des cellules (Tableau 1) indique que la vaste majorité des lymphocytes T spécifiques à Kd/Cw3 a été récupérée. La population adsorbée représente 79,3 % des cellules exprimant CD8+V β 10 dans la population initiale des cellules. Etant donné que l'on ne s'attendait pas à ce que toutes les cellules exprimant CD8+V β 10 dans la population initiale soient spécifiques vis-à-vis de Kd/Cw3, 79,3 % est une estimation minimale du rendement réel. Lorsque des PEL sont adsorbés sur SC-Kd chargé avec un peptide non pertinent, on récupère moins de 0,02 % des cellules.

Ainsi, cette analyse indique que les lymphocytes T exprimant CD8 et V β 10 présents dans les PEL de souris DBA/2 immunisées sont purifiés spécifiquement par adsorption sur des complexes SC-Kd/Cw3.

Afin de mieux comprendre le faible potentiel anti-tumoral des TIL, il a été décidé d'analyser et de purifier des TIL en fonction de leur spécificité. On a injecté par voie sous-cutanée à des souris une dose létale (10^7) de cellules tumorales P815-Cw3. Lorsqu'on utilise ce mode d'injection, les cellules P815-Cw3 prolifèrent généralement, au moins temporairement, comme une tumeur solide largement infiltrée de macrophages, de lymphocytes B et T. Après 10 jours, on prélève les tumeurs, on les dissocie et on analyse les TIL.

Une fraction importante de l'infiltrat tumoral est constituée par des cellules P815-Cw3 (non représenté). Seul, un faible pourcentage des lymphocytes infiltrant les tumeurs P815-Cw3 solides sont spécifiques de la tumeur. Parmi les lymphocytes T, moins de 5 % expriment à la fois CD8 et VB10. Les longueurs de la région CDR3 des chaînes TCR-b sont déterminées par PCR, en utilisant des amorces spécifiques soit à VB10 et CB, soit à VB10 et JB 1.2 (figure 7). A titre de témoin, on a analysé des splénocytes de souris naïves (figure 7, panneaux a et b). On observe des allures typiquement gaussiennes indiquant un répertoire polyclonal. Dans les TIL d'animaux immunisés (figure 7, panneaux c et d), 32 % des transcrits VB10 présentent un CDR3 ayant la longueur de 6 acides aminés compatible avec la spécificité Kd/Cw3. Cette expansion clonale peut être également détectée lorsque l'amorce JB1.2 est utilisée dans l'allongement final (figure 7d).

Pris ensemble, le faible pourcentage des TIL exprimant à la fois CD8 et VB10 et l'analyse du TCRB indiquent qu'une petite fraction des TIL (entre 1 et 2 %) présente l'empreinte de lymphocytes spécifiques de Kd/Cw3 (CD8, VB10 et un CDR3 de 6 acides aminés).

Des TIL spécifiques d'une tumeur peuvent être purifiés par adsorption sur le complexe antigénique CMH/peptide. Afin de purifier des TIL spécifiques à P815-Cw3, on incube des suspensions de cellules individuelles obtenues à partir de tumeurs dissociées avec des billes magnétiques couplées à SC-Kd/Cw3. Des cellules sélectionnées sont analysées à nouveau par cytométrie de flux et PCR, comme dans la section précédente. On détecte très peu de cellules tumorales par cytométrie. Les cellules exprimant à la fois VB10 et CD8 représentent

89 % des cellules purifiées (non représenté). On observe une seule longueur (6 résidus) pour la région de CDR3 de la chaîne TCR β en utilisant des amorces spécifiques de V β 10 et C β (figure 7e). Ce pic est également observé
5 lorsque l'on utilise l'amorce J β 1.2 pour l'allongement final (figure 7f). A titre de témoin, on fait adsorber une fraction des TIL non purifiés sur SC-Kd/PbCS. Très peu de cellules sont récupérées sur des billes couplées à ce complexe non pertinent.

10 Pris ensemble, ces résultats indiquent que, si des lymphocytes T spécifiques de Kd/Cw3 constituent une très petite fraction des TIL, ils peuvent être purifiés de façon efficace et spécifique sur un support solide, par exemple des billes magnétiques. La population purifiée
15 est homogène et elle est composée exclusivement de lymphocytes T exprimant V β 10 et CD8 avec un CDR3 de 6 acides aminés.

Les TIL purifiés sur SC-Kd/Cw3 présentent une activité cytotoxique in vitro accrue. Une des hypothèses
20 avancées concernant les résultats modestes de l'immunothérapie adoptive anti-tumorale est que certains TIL spécifiques d'une tumeur sont anergiques. Par conséquent, on a décidé de vérifier directement leur activité cytotoxique in vitro avant et après adsorption
25 sur des complexes CMH/peptide spécifiques. Les figures 8a et 8b montrent leur activité cytolytique testée sur des cellules cibles P815 et P815-Cw3 marquées au ^{51}Cr . La lyse des cellules cibles P815-Cw3 par des TIL non adsorbés n'est pas significativement plus élevée que
30 celle des P815, comme pouvait le laisser prévoir la faible fréquence des cellules exprimant V β 10 + CD8. Au contraire, les TIL purifiés par adsorption sur SC-Kd/Cw3 lysent spécifiquement P815-Cw3. La purification a non

seulement augmenté l'activité spécifique de CTL, mais elle a également diminué la lyse non spécifique de P815.

Des TIL purifiés et non purifiés sont multipliés in vitro en utilisant IL-2, IL-7 et des splénocytes syngéniques irradiés. D'autres méthodes destinées à l'expansion de cultures de lymphocytes T sont connues dans la technique. Après 10 jours d'expansion en culture, on teste à nouveau l'activité de CTL. Comme représenté à la figure 8d, on observe une lyse plus importante de P815-Cw3 sans augmentation significative de la lyse non spécifique de P815. D'un autre côté, les TIL non purifiés présentent une lyse non spécifique de P815 et de P815-Cw3 (figure 4c). Ces résultats démontrent que les TIL purifiés par adsorption sur des complexes CMH/peptide spécifiques présentent une activité de CTL spécifique qui augmente encore par culture in vitro.

Des TIL purifiés présentent une puissante activité anti-tumorale in vivo.

On a continué à vérifier l'activité anti-tumorale des TIL purifiés in vivo. On a injecté à trois groupes composés chacun de cinq souris, par voie sous-cutanée, 10^7 cellules P815-Cw3. Six jours après injection, on administre à un groupe 10^7 TIL qui ont été purifiés par adsorption sur SC-Kd/Cw3 et amplifiés in vitro, comme décrit dans la section précédente. A un autre groupe, on administre le même nombre de TIL, mais non purifiés in vitro avant amplification. Le troisième groupe ne reçoit aucun TIL. On mesure chaque jour la croissance tumorale et le taux de survie des souris.

La figure 9a montre que si 60 % des souris qui ont reçu des TIL non purifiés sont mortes dans les 27 jours,

toutes les souris qui ont reçu des TIL purifiés ont été protégées. Toutes les souris qui n'ont reçu aucun TIL sont mortes dans les 24 jours. Ces résultats confirment la spécificité des TIL purifiés. Ils indiquent également
5 l'importance des populations purifiées, en développement, des lymphocytes T, comme décrit ici, dans la fourniture d'une activité anti-tumorale in vivo renforcée.

Comme mentionnée ci-dessus, l'immunogénicité de P815-Cw3 est augmentée par transfection de HLA-Cw3,
10 résultant en un potentiel tumorigène réduit. De plus, la réponse immunitaire de souris DBA/2 à P815-Cw3 est quelque peu inhabituelle, du fait que les lymphocytes spécifiques de Kd/Cw3 abritent tous un V β particulier et une longueur de CDR3b particulière. L'éradication réussie
15 de P815-Cw3 pourrait donc résulter d'une affinité exceptionnelle des TCR anti-Cw3 pour leur ligand ou du faible potentiel tumorigène de cette tumeur. Afin de tester la généralité de la présente approche, on a analysé deux différentes tumeurs en utilisant deux
20 différents peptides et une autre molécule du CMH de classe I.

La réponse immunitaire à P815 chez des souris DBA/2 est dirigée contre au moins 4 peptides, dont un dérive de la protéine PlA et est présentée par Ld (25, 26). La
25 tumeur P198 est une variante de P815, dans laquelle une mutation en un seul point a généré un nouvel épitope appelé P198 et présenté par Kd (19). Les TIL ont été purifiés à partir de ces deux tumeurs par adsorption sur des complexes Ld PlA ou SC-Kd/P198, amplifiés in vitro et
30 réinjectés à des souris DBA/2 auxquelles on avait administré précédemment une dose létale (3×10^6) de cellules tumorales P815 ou P198, respectivement.

Le taux de survie des souris est présenté à la figure 9, panneaux b et c. Alors que toutes les souris n'ayant pas reçu d'injection meurent dans les 24 jours, 60 % (b) et 20 % (c) des souris ayant reçu des TIL non purifiés survivent. Lorsqu'on injecte des TIL purifiés par adsorption sur le complexe CMH/peptide pertinent, 100 % et 80 %, respectivement, des souris sont protégées. Ce résultat indique que les TIL spécifiques d'une tumeur pourraient être aussi bien purifiés à partir d'autres tumeurs, avec une activité anti-tumorale in vivo renforcée.

Ingénierie, préparation et utilisation de SC-A2 humain monocaténaire

Construction de plasmide. On prélève à partir de pSC-A2 le fragment Hind III-Hind III codant pour SC-A2, puis on le sous-clone au site de clonage de Hind III du plasmide $p^{RC/CMV}$ (Invitrogen). L'orientation transcriptionnelle sous le contrôle du promoteur CMV a été d'abord vérifiée par cartographie de restriction, puis par séquençage nucléotidique.

La construction SC-A2, qui comprend la séquence signal et les trois premiers domaines de l'ADNc chaîne lourde de HLA-A2.1 fusionnés à la séquence codante de la b2-microglobuline humaine, par l'intermédiaire d'un linker ou charnière flexible de 15 acides aminés, est présentée à la figure 10 avec la séquence nucléotidique correspondante.

Transfection de cellules basophiles. On transfecte 10^7 cellules RBL-2H3 avec 10 mg d'ADN plasmidique pCMV.SC-A2 linéarisé par Pvu I, en utilisant un système d'électroporation (Eurogentec, Sart Tilman, Belgique)

réglé à une impulsion simple, 250 V avec une résistance de shunt de 192 ohm et une capacité de 450 mF. Après 24 heures, on sélectionne d'abord les cellules dans un milieu de culture complet contenant 1 mg/ml de G418 (Gibco, Gaithersbourg, MD), puis on augmente lentement à 4 mg/ml.

Les peptides utilisés dans cette étude (FIOV, I9V, A9L, R8L, Cva, CW3-RYLKNGKETL et Y8I) ont été décrits antérieurement (15, 16) et ont été fournis par Neosystem (Strasbourg, France).

ACM. L'ACM W6.32 anti-HLA-ABC et l'ACM FMC 16 anti- β 2-microglobuline humaine ont été fournis par Valbiotech (France).

Lignée cellulaire. La lignée cellulaire basophile de rat RBL-2H3 a été décrite antérieurement et l'homme du métier sait se la procurer.

Immunoprécipitation de SC-A2 à partir du surnageant de cellules basophiles de rat transfectées par pCMV.SC-A2 (RBL). Cette lignée cellulaire RBL stable, transfectée par SC-A2 (10^7 cellules), est lavée 2 fois et incubée dans 4 ml de milieu complet exempt de méthionine, pendant 30 minutes, puis additionnée de 378 mCi de méthionine ^{35}S pendant 24 heures. A la fin du marquage, on sépare les cellules et le milieu de culture par centrifugation, on soumet le surnageant à une immunoprécipitation en utilisant l'ACM W6.32 ou l'ACM FMC 16 lié à des billes magnétiques (DYNAL), qui réagissent respectivement avec HLA-ABC et la β 2-microglobuline humaine, on sépare les molécules SC-A2 immunoprécipitées dans un concentrateur de particules magnétiques (Dynal), on les lave deux fois avec du PBS froid puis on les analyse par SDS-PAGE.

Préparation de SC-A2 soluble. On purifie SC-A2 soluble monocaténaire en une étape à partir du surnageant de cellules RBL transfectées par pCMV.SC-A2, en utilisant la colonne d'immunoaffinité liée par covalence à l'AcM W6.32, comme décrit préalablement pour la purification de SC-Kd.

Test de liaison peptidique. La liaison peptidique à SC-A2 est mesurée par compétition à l'aide de F10V à marqueur radioactif, comme connu dans la technique. Ce peptide est marqué, comme connu dans la technique, à une activité spécifique de 43 mCi/mmmole, en utilisant une iodation catalysée par la chloramine T. On incube CS-A2 (7 µg) pendant 2 heures à la température ambiante avec 4,5 µM de F10V marqué, en présence d'un excès 60 fois molaire du peptide compétiteur. On élimine le peptide non lié par ultrafiltration en utilisant du Microcon 30 (Amicon) et 7 lavages avec du PBS. Le marquage est mesuré dans les peptides retenus à l'aide d'un spectromètre g (Uammamatic, Kontron).

Cultures de lymphocytes. On isole les PBL sur un gradient Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Suède). On produit des CTL humains primaires dans une culture de 10 jours, par mélange avec des billes (revêtues avec 100 µg de complexe CMH/peptide, comme décrit). Ces cultures sont conduites en présence d'IL-7 et IL-2. Des CTL primaires murins sont générés dans une culture de 10 jours. 10^6 cellules spléniques sont mélangées à 10^7 billes revêtues avec 100 µg de complexe CMH/peptide. L'activité cytolytique des cellules lymphoïdes est alors testée.

Test de la cytotoxicité. On teste la cytotoxicité de suspensions de lymphocytes dans un test de libération de

51Cr standard, en 6 heures, connu dans la technique. Le pourcentage de lyse spécifique de 10⁴ cellules cibles marquées au 51Cr dans 200 µl est déterminé pour divers rapports des lymphocytes aux cellules cibles. Les valeurs de libération spontanée de 51Cr varient entre 5 et 15 % de la totalité du marqueur incorporé. Voir également (68).

Expression de SC-A2 dans des cellules basophiles de rat transfectées (RBL). La lignée cellulaire RBL transfectées SC-A2 stable est marquée pour 36 heures avec la méthionine 35S. Après immunoprécipitation à partir du surnageant à l'aide de l'AcM W6.32, qui réagit avec la β2-microglobuline humaine, et d'un AcM qui réagit avec HLA-ABC, les molécules SC-A2 sont détectables par SDS-PAGE, comme le montre la figure 11A. Pour que la composition soit enrichie en cette molécule, dans un mode opératoire de purification en une étape, on utilise une chromatographie d'immunoaffinité avec une colonne munie d'AcM W6.32 immobilisés. L'éluat de la colonne d'affinité présente une bande principale qui peut être colorée par le bleu de Coomassie, d'environ 48 kDa (figure 11B). Ce mode opératoire conduit régulièrement à l'obtention d'environ 500 µg de SC-A2 par litre de surnageant de culture.

La solubilité de la molécule du CMH n'affecte pas la liaison des peptides pertinents. Après la production et la purification de la molécule du CMH, on a examiné si la molécule SC-A2 purifiée a conservé sa fonctionnalité. La liaison est effectuée au moyen d'un test par compétition, représenté à la figure 12. Trois peptides (F10V, 19V, A9L), dont on sait qu'ils se lient fortement à HLA-A2, inhibent la liaison de F10V marqué par radioactivité à SC-A2, alors que des peptides connus pour se lier à H-2Kb

(R8L, Ova) ou à H-2Kd (Cw3, Y8I) n'ont pas d'action inhibitrice. Dans ce test, la liaison de F10V, marqué par radioactivité, à la molécule de SC-A2, permet d'évaluer que dans cette préparation, il y a 1/7 de molécule fonctionnelle. Du point de vue biochimique, ces molécules sont fonctionnelles et leur fonction d'importance physiologique peut être alors vérifiée.

La Classe I soluble peut activer les lymphocytes T et favoriser leur prolifération. Des billes revêtues avec le complexe Sc-Kd/Cw³ sont introduites dans des cultures de lymphocytes T de souris DBA/2. Après 2 jours de culture, on observe une forte prolifération, aussi forte que pour le témoin positif après 4 jours. Une réponse proliférative tardive est associée à une production forte et prolongée d'IL2.

Induction de CTL primaires spécifiques chez la souris. Afin d'examiner si une densité élevée d'un seul complexe peut induire des CTL primaires, indépendamment de molécules co-stimulatrices, on tente de générer des CTL primaires chez la souris, contre deux peptides connus pour se lier respectivement à des molécules Kd et Ld, à savoir CW3 et PlA. On lie ces molécules complexées à des billes et ensuite, on les ajoute à des splénocytes cultivés naïfs de souris DBA2, complémentés avec de l'interleukine exogène. Après 15 jours de culture, on recueille les cellules lymphoïdes et on examine leur activité cytolytique au moyen d'un test classique au Cr (68), comme présenté à la figure 13A-B. On observe une forte activité cytolytique dirigée contre les deux peptides (figure 13A-B). On détermine que ces cellules sont restreintes par H2 et ont un phénotype CD8. En utilisant deux différents peptides et deux différentes molécules de classe I, on peut provoquer une réponse de

CTL primaire. Ces CTL ont une affinité suffisamment élevée pour reconnaître un peptide endogène exprimé sur les cellules tumorales P815 et P815-HLA CW3.

5 *Induction de lymphocytes T cytotoxiques peptide-spécifiques chez l'homme.* On suit la même voie en utilisant une molécule HLA A2 soluble. On lie le complexe CMH/peptide à des billes et on utilise ces dernières en tant qu'APC dans des co-cultures primaires avec des PBL de donneurs sains. Après trois cycles de stimulation, on
10 est capable de détecter une activité cytotoxique spécifique à chacun des deux différents peptides utilisés : l'un issu de la tumeur mélanome (mage3) ; le second peptide, de la protéine polymérase (pol) de VIH. Les résultats sont présentés sur les figures 14-15.

15 *L'induction de CTL spécifiques primaires utilisant une densité élevée de complexe CMH/peptide est indépendante de la présence d'APC professionnelles.* Afin de voir si la présentation du peptide aux lymphocytes T est due à la reconnaissance directe du complexe
20 CMH/peptide sur les billes ou au traitement du complexe par des macrophages, on supprime les macrophages de la culture primaire à l'aide d'une colonne Nylon-Wood. On co-cultive alors des lymphocytes T avec des billes et on compare l'aptitude de cette culture à induire une
25 activité cytolytique à celle de la culture non dépourvue de macrophages. On n'observe pas de différence significative entre les activités cytolytiques. Le fait qui démontre clairement que la présentation et l'activation de CTL spécifiques sont indépendantes des
30 APC naturelles, notamment des cellules dendritiques, des macrophages et des lymphocytes B, c'est que la suppression de ces cellules n'abroge pas l'induction des CTL. De plus, la nécessité de la présence d'une molécule

du CMH, ici du CMH de classe I, est démontrée, étant donné que les billes revêtues avec le peptide seul n'induisent pas les CTL.

5 L'efficacité de la présentation de peptide par des billes revêtues avec CMH/peptide est aussi bonne que la présentation par des cellules dendritiques. Pour évaluer l'efficacité de billes à présenter un antigène peptidique à des lymphocytes T naïfs, ce qui conduit par la suite à l'activation de ces derniers, on compare parallèlement 10 l'aptitude de différentes APC à activer in vitro les CTL primaires. Trois différentes APC sont comparées à des cellules dendritiques, des lymphocytes B après élimination des peptides (comme déjà décrit) revêtus avec le peptide CW3, en utilisant les mêmes conditions de 15 culture. Dans ces conditions, on observe après induction le même ordre de grandeur de l'activité cytolytique dans la culture après 10 jours, ce qui démontre que la densité élevée de CMH peut compenser l'absence d'antigènes co-stimulateurs, connus pour être sur-exprimés sur les 20 cellules dendritiques.

Activité anti-tumorale utilisant des CTL primaires induits par le complexe CMH/peptide. Une dose élevée de peptides exogènes, sans la compétition de peptides internes, peut être avantageuse pour générer des cellules 25 effectrices contre des antigènes spécifiques d'une tumeur. La faisabilité de cette approche est testée par incubation de cellules spléniques non séparées de souris DBA2 avec des cellules Ld et un peptide synthétique de DBA2. Après 10 jours de culture, on réintroduit ces 30 cellules dans la souris à laquelle on a greffé des tumeurs. Les cellules réintroduites conduisent avec succès à la disparition des tumeurs.

Des CTL primaires spécifiques ont une affinité suffisamment élevée pour reconnaître un peptide endogène. On examine ces CTL primaires pour savoir s'ils reconnaissent un peptide endogène chez la souris. Des CTL
5 PlA spécifiques sont capables de tuer des cellules P815. Des CTL induits de manière appropriée tuent des cellules infectées par la grippe, des cellules de mélanome humain et des cellules infectées par VIH.

Ainsi, les CTL générés par les méthodes selon la
10 présente invention peuvent être utilisés dans des techniques d'immunothérapie et ils peuvent être utilisés dans la recherche et le développement d'immunothérapies telles que les protocoles d'immunothérapie adoptive
15 connus dans la technique.

EXEMPLE 2 : Induction *in vitro* de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques en utilisant des complexes peptide/molécule monocaténaire du CMH de classe I
20 recombinante

MATERIELS ET METHODES

Peptides et réactifs sérologiques 25

Les peptides utilisés sont listés dans le tableau 4 et proviennent de Neosystem (Strasbourg France). Les AcM W6.32 (anti-HLA-ABC) et FMC 16 (anti-B2-m humain) : Valbiotech (Paris, France). Les AcM B2.62.2 (anti-B2-m
30 humaine) et les AcM anti-HLA-A2.1 BB7.2, MA2.1, PA2.1 et 5H7 ont été décrits dans McMichael et al, 1980 *Human Immunology* 1:121-129; Parham et Brodsky, 1981 *Human Immunology* 3:277-299; Parham et Bodmer, 1978 *Nature*

276:397-399; Smith et al, 1994 *Journal of Immunology* 153:1054-1067.

Lignées cellulaires

5

La lignée cellulaire de basophiles de rat, RBL-2H3 a été décrite dans Engel et al, 1992 *Science* 256:1318-1321. La lignée cellulaire 174CEM.T2 (Celis et al, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2105-2109), les cellules P815 (TIB 64, American Type Culture Collection, Rockville, MD) et les transfectants P815/HLA Cw3 (Maryanski et al, 1986, *J. Immunol.* 136: 4340-4347) ont été cultivés sur RMPI-1640 complémenté avec SFV 10%, L-glutamine 2 mM, pyruvate de sodium 10 mM, Hepes 10 mM, 2-mercapto-éthanol $5 \times 10^{-5}M$ et des antibiotiques (milieu SFV complet).

10

15

Construction des plasmides et transfections des cellules basophiles

20

La séquence $\beta 2$ -m humaine (Suggs et al, 1981 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6613-6617) a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces suivantes :

GGGGGGATCCATCCAGCGTACTCCAAAGATT et

25

GGGGAAGCTTCCAATCCAAATGCGGCATCTT. Après digestion par BamHI and HindIII, le fragment amplifié de 350 pb a été cloné dans M13mpl8, pour donner M13/hu $\beta 2$ m. La séquence HLA-A2.1 est dérivée d'un ADNc longueur totale (Ennis et al, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2833-2837). Tout d'abord, un fragment de 410 pb produit par digestion avec SalI and KpnI et codant pour les 113 premiers résidus de HLA-A2 a été purifié. Ensuite, un fragment de 500 pb codant pour les résidus 114 à 274 de HLA-A2.1 a été amplifié par PCR et fusionné à un motif (Gly)₄Ser en utilisant les amorces suivantes :

30

CTTCCTCCGCGGGTACCACC et
GGAAGGATCCACCGCCACCCCATCTCAGGGTGAGGGGCTTGGGCAA.

5 Ce produit PCR a été digéré par KpnI et BamHI. Les deux
fragments ont été fusionnés ensemble et clonés dans
M13mp19 clivé par SalI et BamHI, pour donner M13- α 1 α 2 α 3.
Le SalI-BamHI fragment de 920 pb de M13- α 1 α 2 α 3 codant
pour les résidus 1 à 274 de HLA-A2 fusionné à un linker
flexible long de 5 résidus a ensuite été inséré dans
10 M13/huB2m clivé par BamHI et SalI, pour donner M13-SC-A2
(75). Dix résidus additionnels Ser(Gly)₄Ser(Gly)₄ ont été
subséquemment insérés dans le linker en clonant les
oligonucléotides GATCAGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCG et
GATCCGCGCCACCCGACCCACCACCGCCT au site BamHI de M13-SC-A2
15 ((Sette et al, 1994, *J. Immunol.* 153:5586-5592). Le phage
résultant appelé M13-SC-A2 (Houbiers et al, 1993, *Eur.*
J. Immunol. 23:2072-2077) a été séquencé. Le fragment
HindIII de 1300 pb contenant l'insert complet a ensuite
été sous-cloné dans pRc/CMV (Invitrogen, Leek, Pays-Bas)
20 au site HindIII, pour donner pCMV.SC-A2. L'orientation de
transcription sous le contrôle du promoteur CMV a d'abord
été vérifiée par carte de restriction et séquençage
nucléotidique. Les cellules RBL-2H3 (10⁷) ont été
transfectées par 10 μ g d'ADN du plasmide pCMV.SC-A2
25 linéarisé par Pvu I, en utilisant un système
d'électroporation Cellject (Eurogentec, Sart Tilman,
Belgique) réglé à impulsion simple, 250 V avec une
résistance de shunt de 192 ohm et une capacité de 450 μ F.
Après 24 heures, les cellules ont été sélectionnées sur
30 un milieu de culture SFV complet contenant 1 mg/ml de
G418 (Gibco, Gaithersburg, MD). La sélection a été
poursuivie par augmentation progressive de la dose
d'antibiotique jusqu'à 4 mg/ml.

Préparation de SC-A2 soluble

SC-A2 a été purifiée à partir du surnageant de cellules RBL-2H3 transfectées par pCMV.SC-A2 par chromatographie d'affinité en utilisant l'anticorps W6.32.

Résonance de surface de plasmons

Les analyses ont été conduites sur un BIAcore (Pharmacia Biosensor), à 20°C en utilisant un flux de 5 µl/min. L'anticorps anti-HLA-A2 BB7.2 a été immobilisé sur un support sensible CM5 préalablement activé par un 35 µl de mélange NHS/EDC, et les motifs n'ayant pas réagi ont été bloqués avec de l'éthanolamine 1M, pH8,5.

Test de liaison de peptides

La liaison des peptides à SC-A2 a été testé par compétition en utilisant le peptide radiomarké F10V (Ruppert et al, 1993 *Cell* 74:9229-937). Ce peptide a été marqué de manière à présenter une activité spécifique de 43 mCi/mmol en utilisant la ioduration catalysée par la chloramine T (Hunter et Greenwood, 1962, *Nature* 194:495-496). SC-A2 (7 µg) a été incubé pendant 2 heures à température ambiante avec 4,5 µM de F10V marqué en présence d'un excès molaire d'un facteur de 60 du peptide compétiteur. Les peptides non liés ont été éliminés par ultrafiltration en utilisant Microcon 30 (Amicon Inc, Beverly, MA) et des lavages au PBS. La radioactivité dans la fraction retenue a été mesurée sur un spectromètre γ (Gammamatic, Kontron).

Prolifération et sécrétion IL-2

Le clone CTL NA17-221, spécifique du peptide NA17-A présenté par HLA-A2.1, a été cultivé dans des plaques à 5 96 puits, dans 200 µl de milieu FCS complet, en présence de la concentration indiquée de complexes peptide/SC-A2 dimérisés par ACM FMC16. La prolifération a été mesurée après 48 heures par l'incorporation de thymidine ³H. La sécrétion IL-2 a été suivie à 24 heures en mesurant la 10 capacité du surnageant de culture à alimenter la prolifération de la lignée cellulaire IL-2-dépendante CTLL-2.

Induction de CTL *in vitro*

15 Des souris mâles DBA/2 ont été obtenues auprès du Centre d'Elevage R. Janvier (Le Genest-Saint Isle, France) et ont été utilisées à l'âge de 8 à 12 semaines. Les cellules dendritiques (CD) ont été préparées selon les 20 protocoles standards d'enrichissement par centrifugation de cellules spléniques sur une solution de BSA à 35% (Sigma-Aldrich, l'Isle d'Abeau Chesnes, France) et par adhérence plastique de la fraction de cellules spléniques à faible densité (Coligan et al, 1993, *Current Protocols* 25 *in Immunology*. John Willey and Sons, Inc, Boston). Des cellules T enrichies sur tissu de nylon ($1,5 \times 10^7$) ont été cultivées soit avec 10^5 CDC pulsées 4 à 6 heures au préalable par 100 µg de peptide CW3 ou NP, ou avec des complexes SC-Kd/peptide couplés sur des billes (5×10^6). 30 Les cultures ont été réalisées dans 5 ml de milieu SFV complet complémenté avec 20 ng/ml de rIL6 de souris (Immugenex Corp, Los Angeles, CA) et 0,5 ng/ml de rIL12 de souris (R & D Systems Europe Ltd., UK) dans des flacons de 25cm² maintenus à 37°C sous atmosphère

humidifiée contenant 6% de CO₂. Trois et cinq jours après le début de la culture, rIL2 humain (Immugenex) a été ajouté aux cultures de manière à donner une concentration finale de 10 U/ml. Les cultures ont été re-stimulées le jour 7 en utilisant des cellules spléniques (1×10^7) irradiées (3000 rad) activées par 50 µg de peptide, sur 2 ml de milieu SFV complet contenant 1 ng/ml de rIL7 de souris (Immugenex) et 10 U/ml de rIL2 humain. De l'αIL2 humaine additionnelle (en final 20 U/ml) a été fournie le jour 10 et les cultures ont été testées quant à leurs activités cytolytiques au jour 12-14.

Les réponses CTL *in vitro* ont été obtenues sur des PBMC issues de volontaires normaux sains HLA-A2.1 en utilisant des complexes SC-A2/peptide couplés sur des billes.

Brièvement, des PBMC (3×10^7) purifiées au Ficoll ont été cultivées avec des complexes SC-A2/peptide couplés sur des billes (10^7). Les cultures ont été maintenues sur du RPMI-1640 complet complémenté avec 10% de sérum humain AB inactivé par la chaleur (milieu AB complet) et avec 10 ng/ml de tIL-7 (Genzyme S.A., Paris, France), 2 ng/ml de rIL-12 (Genzyme), à 37°C dans un incubateur à 5% de CO₂. Le milieu de culture avec cytokines a été réapprovisionné tous les 3 jours. Au jour 10, les cultures ont été re-stimulées par 10^7 blasts T autologues irradiés (3000 rad) activés par ConA pulsés par des peptides ou par 140 mM de complexes peptide/SC-A2 monomérique. Les cultures ont été maintenues dans du milieu AB complet contenant 10 ng/ml de rIL7 humain et 10 U/ml de rIL2. Du milieu frais avec des cytokines a été ajouté tous les 3 jours. L'activité cytotoxique a été mesurée 8 jours après la restimulation.

Test de cytotoxicité

Des cellules P815 ($3-5 \times 10^6$) pulsées par 50 µg de peptide Cw3 ou NP et des transfectants P815/HLA-Cw3 ont été radiomarquées par ^{51}Cr pendant 90 min à 37°C dans du milieu RPMI-1640. Elles ont ensuite été lavées trois fois dans le même milieu, remises en suspension dans du milieu FCS complet et ensuite ajoutées (5000) à des cellules effectrices. La lignée cellulaire T2 (3×10^6 cellules) a été pulsée durant toute la nuit par 200 µg de peptides dans 2 ml de milieu RPMI-1640 dépourvu de sérum à 26°C. Elles ont ensuite été radiomarquées par ^{51}Cr comme indiqué pour les lignées cellulaires murines. L'activité cytolytique a été déterminée par un test standard de libération de ^{51}Cr de 4 h en utilisant des plaques à 96 puits à fonds en U. Le pourcentage de cytotoxicité a été déterminé par la formule: $100 \times (\text{libération expérimentale} - \text{libération spontanée}) / (\text{libération maximale} - \text{libération spontanée})$. La libération maximale a été déterminée par lyse des cellules cibles à l'aide de 1% de triton X-100 (Sigma). Les valeurs de libération spontanée de ^{51}Cr varient entre 10 et 20% du marquage total incorporé.

Analyse du répertoire

Les analyses des TCR-β humain et de souris ont été réalisées telles que décrites dans (92) et (93). Brièvement, l'ARN total a été extrait et soumis à transcription inverse et PCR en utilisant des amorces spécifiques de TCR-BC et TCR-BV. Les produits PCR ont été marqués par une amorce fluorescente spécifique de TCR-BC et ont été séparés selon les tailles dans un séquenceur à ADN automatique 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA). Les analyses ont ensuite été réalisées à l'aide du logiciel Immunoscope.

Résultats

5 Caractérisation structurelle des molécules monocaténaires du CMH de classe I

10 Une construction SC-A2 a été réalisée, elle comprend la séquence signal et les trois premiers domaines de l'ADNc de la chaîne lourde de HLA-A2.1 fusionnés à la séquence
15 codante de la β 2-m humaine par l'intermédiaire d'un linker flexible de 15 acides aminés. Cette construction a été transfectée dans des cellules RBL-2H3. Les transfectants stables ont été sélectionnés et criblés par PCR en fonction de la présence de la construction génique
intégrée. La production SC-A2 des clones positifs a été analysée. Un clone a produit environ 500 μ g de SC-A2 par litre de surnageant de culture et a été sélectionné pour de plus amples analyses.

20 La molécule SC-A2 sécrétée a été purifiée par chromatographie d'immunoaffinité en utilisant l'AcM W6/32 (anti-HLA-A.B.C) et a été caractérisée par résonance de surface de plasmons en utilisant les AcM BB7.22 (anti-HLA-A2, -A69) et B2.62.2 (anti- β 2-m humaine). Les
25 résultats présentés en figure 17 démontrent qu'elle présente à la fois les déterminants sérologiques dérivés de la β 2-m humaine et de HLA-A2. Des tests ELISA réalisés avec un panel d'AcM comprenant W6/32, BB7.2, 5H7 (anti-3ème domaine de HLA-A2), PA2.1 (anti-HLA-A2), B2.62.2 et
30 BBM.1 (anti- β 2-m humaine) ont permis de vérifier que la molécule SC-A2 recombinante est correctement repliée. Tous les AcM testés ont réagi seuls ou en sandwich (anti-HLA-A2)/anti- β 2-m humaine) avec la molécule recombinante

ce qui suggère que celle-ci présente la conformation correcte.

5 **Caractérisation fonctionnelle des molécules
monocaténaires du CMH de classe I**

Il a tout d'abord été vérifié que SC-A2 se lie
spécifiquement aux peptides restreints par HLA-A2. Un
peptide synthétique, F10V, dérivé du virus de l'hépatite
10 B et connu pour se lier à HLA-A2, a été utilisé comme
étalon pour les expériences de compétition. Le peptide
F10V radiomarké a été mélangé à SC-A2 tel que décrit ci-
dessus. Les peptides non liés ont été éliminés par
ultrafiltration et la radioactivité associée à SC-A2 a
15 été mesurée. Une liaison significative à SC-A2 a été
observée : les résultats illustrant la liaison du peptide
F10V radiomarké à des molécules SC-A2 sont présentés en
figure 22A (où sont portées les mesures en cpm x 10⁻⁴ de
peptides liés radiomarkés en présence ou en l'absence de
20 SC-A2). A partir de l'activité spécifique du peptide
radiomarké, on a calculé que plus de 50% des protéines
SC-A2 sont actives pour la liaison aux peptides. Cette
liaison est peptide-spécifique puisqu'elle est inhibée
d'une manière dose-dépendante par des peptides restreints
25 par HLA-A2 non marqués (F10V, HIV pol, M58-66, Mage-3,
NA17A, Melan-A/MART-1) mais pas par des peptides
restreints par H-2K^d (CW3, HA) ajoutés en excès en tant
que compétiteurs. Ces résultats sont illustrés par la
figure 20B où sont portées en abscisse la concentration
30 de peptides compétiteurs en micromolaire et en ordonnées
la liaison de peptides marqués (cpm x 10⁻⁵). Les peptides
restreints par HLA-A2.1 (F10V, I9V et A9L) donnent une
inhibition presque complète de la liaison du peptide
marqué, contrairement à ce qui est observé avec les

peptides restreints par H-2K^b (R8L, OVA) et les peptides restreints par H-2K^d (CW3, Y8I). Ces résultats indiquent que la molécule SC-A2 recombinante se lie aux peptides synthétiques et présente la même spécificité que la

5 . molécule HLA-A2 associée à la surface de cellule native.

La capacité de SC-A2 recombinante à agir comme une molécule présentatrice d'antigène a ensuite été évaluée. La SC-A2 purifiée a été chargée avec le peptide de

10 mélanome NA17-A, dimérisée en utilisant un anticorps anti-B2m et utilisée pour stimuler le clone CTL NA17-221. Les résultats sont illustrés par les figures 23A et 23B. En figure 23A, on donne la sécrétion d'IL-2 (cpm) en fonction de la concentration en SC-A2 (µg/ml) ; la teneur

15 en IL-2 a été mesurée à 24 heures par la prolifération de CTLL-2. En figure 23B, on donne la prolifération cellulaire (cpm) en fonction de la concentration en SC-A2 (µg/ml) ; la prolifération des cellules T a été déterminée à 48 heures par l'incorporation de thymidine

20 ³H. Le clone CTL NA17-221 spécifique du peptide NA17-A présenté par HLA-A2.1 a été cultivé avec la concentration indiquée de peptide/SC-A2 dimérisé ; dans les deux figures, les cercles blancs représentent le peptide NA17-A et les carrés noirs le peptide MAGE-3. Dans les

25 deux essais de prolifération (figure 23A) et de sécrétion d'IL2 (figure 23B), la réponse obtenue est peptide spécifique puisque SC-A2 chargée avec un peptide non approprié (MAGE-3) n'a présenté aucune activité. Le peptide NA17-A seul n'a eu aucun effet sur le clone CTL

30 NA17-221. Les réponses spécifiques observées avec le clone NA17-221 démontrent que le complexe SC-A2/peptide interagit de manière productive avec le TCR qui lui correspond.

Prises ensembles, ces données établissent que la molécule SC-A2 présente toutes les propriétés voulues et présentent les mêmes caractéristiques que sa contrepartie murine. La capacité de ces molécules à provoquer des
5 réponses CTL spécifiques *in vitro* a ensuite été étudiée.

Couplage des complexes peptide-CMH recombinants à des billes

10 On a cherché à déterminer si des CTL spécifiques pouvaient être induits *in vitro* par des molécules SC-CMH chargées avec un peptide antigénique. Pour maximiser la densité des complexes peptide/SC-CMH, on a préparé des billes auxquelles un grand nombre de complexes a été lié
15 par l'intermédiaire d'un anticorps spécifique soit du domaine α -3 de SC-Kd soit du domaine β 2-m de SC-A2.

Pour évaluer l'efficacité de couplage de SC-A2 sur les billes, l'expérience suivante a été réalisée. Le peptide
20 F10V radiomarké a été incubé avec SC-A2 purifié. Les peptides non liés ont été éliminés par ultrafiltration et le complexe peptide-CMH radioactif a été incubé avec des billes Dynabeads tosyl-activées couplées avec un anticorps anti- β 2-m humaine. Après lavage approfondi, la
25 radioactivité associée aux billes a été mesurée et utilisée pour évaluer la quantité de SC-A2 couplée aux billes. En l'absence de SC-A2, 100 fois moins de radioactivité associée aux billes a été trouvée. Environ 10^5 molécules SC-A2 étaient ainsi couplées sur chaque
30 bille. Ce nombre correspond à une densité de $1,7 \times 10^{15}$ molécules par m^2 , ce qui représente au moins 10 fois plus que la densité totale de molécules CMH à la surface d'APC naturelles. De plus, en considérant qu'une APC naturelle présente de l'ordre de 10^4 peptides différents et que la

représentation maximale d'un peptide donné à la surface est de 10%, il peut être conclu que la densité d'un complexe peptide/CMH spécifique à la surface des billes est au moins deux fois supérieure à celle d'APC naturelles.

Induction *in vitro* de CTL spécifiques par des complexes de peptide-CMH couplés à des billes

La capacité des billes à stimuler des CTL *in vitro* a été évaluée chez des systèmes humain et de souris. SC-Kd a été chargé avec le peptide CW3 (170-179) restreint par K^d dérivé de HLA-CW3 ou le peptide NP(147-155) dérivé de la nucléoprotéine du virus influenza (130). De tels complexes peptide/SC-Kd ont alors été couplés à des billes tel qu'indiqué ci-avant et ajoutés à des splénocytes de souris DBA/2 non-adhérents au tissu de nylon. Pour permettre une comparaison avec un témoin positif, des stimulations ont aussi été réalisées avec des cellules dendritiques pulsées par des peptides (109, Nair et al, 1993, *J. virol.* 67:4062-4069; 108). Sept jours plus tard, toutes les cultures ont été re-stimulées avec des cellules spléniques pulsées par des peptides CW3 ou NP irradiées. Cinq à six jours plus tard, l'activité cytotoxique a été mesurée sur des transfectants P815/HLA-CW3 et P815 ou sur des cellules cibles P815 pulsées par des peptides CW3 et NP. Les résultats sont représentés en figures 24A et B (en abscisse, ratio effecteurs : cible ; en ordonnée pourcentage de lyse spécifique). Des CTL ont été induits par des cellules dendritiques pulsées par des peptides (figure 24A) ou par des complexes peptide/SC-Kd couplés à des billes (figure 24B). Les peptides utilisés pour l'induction sont CW3 pour les graphes de gauche et NP pour les graphes de droite. L'activité cytotoxique a

été mesurée sur P815 (carré blanc), P815-CW3 (carré noir), P815 pulsée avec NP (cercle noir) ou avec CW3 (cercle blanc). Ces résultats montrent qu'une activité lytique peptide-spécifique significative a été détectée, que le stimulus d'immunisation utilisé ait été des cellules dendritiques ou des billes chargées de peptide/SC-Kd. Les courbes de cytotoxicité suggèrent que les deux procédures présentent des efficacités d'induction et d'expansion de CTL peptide/spécifique comparables.

Une étude similaire a été menée chez l'homme en utilisant des PBL de donneurs HLA-A2 naïfs. De tels PBL ont été cultivés pendant 10 jours avec des billes couplées avec des complexes SC-A2/peptide M58-66 de la protéine matrice d'influenza A (131, 132). Les cultures ont été re-stimulées une fois avec soit des ConA-blasts pulsés par des peptides M58-66 ou des complexes SC-A2/peptide M58-66 pendant huit jours et leur activité cytotoxique a ensuite été mesurée sur des cellules cibles T2 chargées de peptide. Les résultats sont illustrés par les figures 25A et B (en abscisse, ratio effecteur : cible; en ordonnée, pourcentage de lyse spécifique). Les cultures CTL induites avec les complexes SC-A2/M58-66 couplés aux billes ont été re-stimulées avec des blasts ConA activés, pulsés par des peptides (figure 25A) ou avec 140 mM M58-66/SC-A2 monomérique (figure 25B). L'activité cytotoxique a été mesurée sur des cellules T2 (carré blanc) ou sur des cellules T2 pulsées par M58-66 (carré noir) ou sur des cellules T2 pulsées par MAGE-3 (triangle noir). Comme illustré par les figures 25A et B, une lyse spécifique significative est observée. La même observation a pu être réalisée en utilisant un second peptide restreint par HLA-A2 dérivé de l'antigène Melan A/Mart 1.

Ces résultats montrent que les complexes peptide/CMH couplés sur des billes sont à peu près aussi efficaces pour induire des CTL primaires *in vitro* que des APC professionnels telles que les cellules dendritiques.

Les CTL induits *in vitro* présentent des réarrangements du TCR similaires à ceux des CTL amorcés *in vivo*

Les résultats exposés ci-dessus montrent que les complexes peptide/CMH couplés sur des billes peuvent générer des CTL *in vitro* en l'absence de molécules de co-stimulation ajoutées. Pour déterminer la pertinence de tels CTL par rapport à ceux obtenus par suite d'une immunisation *in vivo*, on s'est basé sur l'observation que, dans certaines circonstances, les réponses de cellules T à des antigènes donnés présentent des réarrangements publics, c'est-à-dire des réarrangements qui émergent de manière récurrente après immunisation d'individus distincts. Les réarrangements publics TCR-BV dans la réponse contre le peptide CW3 restreint par Kd sont particulièrement bien connus de l'homme du métier (Casanova et al, 1992, *J Exp Med* 176:439-447; MacDonald et al, 1993, *J Exp Med* 177:1487-1492; Maryanski et al, 1996, *Immunity* 4: 47-55; Walker et al, 1995, *J Immunol* 155:3443-3452). On a donc comparé les réponses CTL *in vitro* et *in vivo* à ces deux peptides en utilisant la technologie Immunoscope (déjà évoquée (4, 92).

Le répertoire TCR de populations de CTL isolées à partir de souris DBA/2 immunisées par des transfectants P815-HLA-CW3 reflète le développement sélectif de lymphocytes portant BV10. De plus, après analyse de 23 clones CW3-spécifiques, tous BV10+, seulement cinq segments BJ ont

été trouvés, le BJ1S2 étant dominant, et tous présentent des boucles CDR3 de 6 acides aminés (11). Les profils obtenus pour les TCR-BV10 de populations de cellules spléniques DBA/2 stimulées *in vitro* par CW3 sont représentés sur la Figure 26 qui représente les réarrangements de la chaîne TCR- β de CTL induits *in vitro*. Les CTL ont été induits par le peptide indiqué. La taille en acides aminés du CDR3 indiquée est telle que définie par Chothia et al. 1988, EMBO J. 7: 3745-3755. Un pic majeur à 6 acides aminés est la marque de CTL CW3-spécifiques. L'ARN extrait de splénocytes naïfs ou de CTL NP-spécifiques est présenté pour comparaison. Comme il peut être observé, le peptide CW3 présenté par des cellules dendritiques ou des billes SC-Kd conduit à la génération de populations de cellules T qui présentent, pour le TCR-BV10, un pic majeur correspondant à un CDR3 long de 6 acides aminés. Des analyses additionnelles ont mis en évidence une association prédominante d'un tel CDR3 avec un segment BJ1S2. Ce répertoire TCR-BV10 présente donc les mêmes caractéristiques que celui de CTL CW3-réactifs générés par amorçage *in vivo*. A titre de comparaison, la Figure 26 présente le profil TCR-BV10 obtenu pour des cellules T générées, dans une expérience conduite en parallèle, contre le peptide NP.

Il a été reporté que chez la plupart des sujets HLA-A2.1, une réponse CTL M58-66-spécifique est détectable après une infection par influenza A. De manière intéressante, les lignées CTL M58-66-spécifiques dérivées de 21 individus HLA-A2 non apparentés présentent TCR-BV17 comme segment BV dominant utilisé. Le développement de cellules CD8+BV17+ est corrélé avec la lyse M58-66-spécifique (89, 90). De plus, l'analyse des séquences de 38 transcrits BV17 M58-66-spécifiques issus de 13 sujets a mis en évidence une grande conservation dans la région

CDR3 de 8 acides aminés. Les profils TCR-BV17 obtenus pour des PBL témoins non stimulés et pour des PBL stimulés par des billes couvertes par des complexes SC-A2/M58-66 sont illustrés sur les Figures 27A et B (profils d'intensités de fluorescence). Les CTL générés par SC-A2/M58-66 couplé sur des billes ont été re-stimulés par des blastes ConA pulsés par des peptides (Figure 27A) ou par des complexes M58-66/SC-A2 monomérique (Figure 27B) comme en Figure 25. L'ARN total a été analysé en utilisant des amorces BV17-spécifiques (graphes du bas) ou BV2-spécifiques (graphes du haut). Le pic majeur observé avec les amorces BV17 correspondant à un CDR3 long de 8 acides aminés est la marque de CTL M58-66-spécifiques. Les répertoires BV2 et ceux de PBL non stimulés sont montrés à titre de comparaison. Les profils TCR-BV17 de PBL stimulés montrent donc un pic majeur correspondant à un CDR3 d'une longueur de 8 acides aminés, ce qui suggère un développement spécifique de la population de cellules T qui a été impliquée dans la lyse M58-66-spécifique. Par contraste, les PBL témoins donnent un profil TCR BV17 de type Gaussien, ce qui indique un répertoire polyclonal. A titre de comparaison, les profils TCR BV2 présentent une forme Gaussienne pour les PBL témoins et les PBL stimulés.

Ces résultats indiquent que les protocoles in vitro d'induction utilisant des billes permettent de développer des populations de cellules T présentant des caractéristiques de structure similaires à celles générées par une immunisation *in vivo*.

La construction de SC-A2 a permis de disposer d'une molécule recombinante monocaténaire, soluble. Cette molécule purifiée a montré qu'elle était correctement

repliée et se liait spécifiquement aux peptides antigéniques restreints par HLA-A2, ce qui suggère qu'elle sélectionne le même répertoire peptidique que la molécule HLA-A2 associée à la surface cellulaire native.

5 De plus, les travaux réalisés ont montré que les complexes SC-A2/peptide stimulent les CTL peptide-spécifiques pour les faire proliférer et sécréter IL-2, ce qui indique bien que SC-A2 interagit avec le récepteur cellulaire T approprié.

10 La capacité des complexes SC-Kd et SC-A2/peptide à activer les précurseurs de CTL peptide-spécifiques *in vitro* a également été étudiée.

Les résultats obtenus ont montré qu'il est possible d'induire une expansion de CTL spécifiques vis-à-vis de peptide de HLA-Cw3 et du virus NP de l'influenza dans des cultures de cellules naïves de rate de souris stimulées par des complexes SC-Kd/peptide couplés sur des billes. Leur efficacité, comme déjà souligné, s'est révélée comparable à celle d'APC connues, comme les cellules dendritiques.

20 En ce qui concerne le peptide HLA-Cw3, on a constaté que les CTL générés par l'un quelconque des modes de présentation d'antigène étaient capables de lyser les transfectants P815/HLA-Cw3, ce qui indique une reconnaissance par ces CTL d'épitopes formés par voie endogène. Cette observation revêt une grande importance puisqu'il a été rapporté, dans certains cas, que les CTL générés *in vitro* n'étaient pas capables de tuer des cibles exprimant un antigène formé naturellement et que la reconnaissance d'un antigène exprimé par voie endogène est considérée comme un élément indicateur pertinent *in vivo*.

30 L'analyse du répertoire TCR- β de populations cellulaires T stimulées *in vitro* par CD activé par Cw3 ou SC-

Kd/peptide Cw3 apporte la preuve d'une expansion significative et spécifique de lymphocytes BV10+ avec un CDR3 de 6 acides aminés associés avec un segment prédominant BJ1S2.

5 On a pu constater que les CTL générés à partir d'une immunisation *in vivo* avec HLA-Cw3 présentent les mêmes caractéristiques.

De la même manière, une réponse CTL spécifique du peptide M58-66 de l'influenza A et de Melan A/Mart 1 a été
10 provoquée dans PBL à partir de donneurs sains HLA-A2.1, en utilisant des billes couplées à SC-A2/peptide, comme agent de stimulation de l'immunisation.

Ces CTL induits sont capables de tuer efficacement des cellules T2 activées par le peptide.

15 Dans le cas de CTL influenza-spécifiques (pour lesquelles une réponse a déjà été décrite), l'analyse de leur répertoire TCR-BV indique l'expansion spécifique de populations cellulaires utilisant de manière prédominante TCR-BV17 avec une région CDR3 de 8 acides aminés, comme
20 décrit pour les CTL, présentent une spécificité vis-à-vis du peptide M58-66 généré après une infection par le virus de l'influenza *in vivo*.

La nécessité de 2 signaux pour les cellules T non sensibilisées correspond à une notion largement admise.

25 Le signal-1 provient de la ligation du TCR et de ses co-récepteurs avec les complexes CMH/peptide. Le signal-2, qui n'est pas antigène-spécifique, est généré par l'interaction de molécules co-stimulatrices exprimées sur les APC et leurs molécules apparentées sur les cellules
30 T. L'importance du signal de transduction via la liaison de CD28 de cellules T aux molécules B7.1 ou B7.2 sur les APC afin d'obtenir une stimulation optimale des cellules T non sensibilisées a été souligné dans de plusieurs rapports. Or , il apparaît que les complexes CMH/peptide

couplés aux billes, utilisés selon l'invention, ne fournissent pas la co-stimulation normalement procurée par l'interaction CD28-B7. La forte densité de complexes CMH/peptide sur les billes peut ainsi permettre de se libérer de la nécessité d'avoir des molécules co-stimulatrices.

La contribution possible de macrophages ou d'autres cellules possédant des propriétés de phagocytose vis-à-vis de la sensibilisation de CTL via la prise de complexes CMH/peptide/billes et de re-présentation de peptide.

La disponibilité des molécules recombinantes SC-CMH de classe I revêt un grand intérêt. Elles peuvent être utilisées non seulement dans un essai de liaison CMH/peptide rapide, sensible et fiable pour identifier des épitopes de cellules T se liant au CMH avec une affinité élevée, mais également dans une induction de CTL primaires pour définir, parmi les agents de liaison au CMH, ceux des peptides qui sont immunogènes.

Les résultats exposés ci-dessus établissent que des molécules de classe I biologiquement actives, recombinantes, murines et humaines, peuvent être utilisées pour induire *in vitro* des CTL primaires peptide-spécifiques et que les CTL générés sont qualitativement similaires à ceux obtenus *in vivo*.

On mesurera l'intérêt d'un tel système qui permet de procéder à des analyses détaillées de répertoires de CTL humains et murins et d'élucider les mécanismes de sensibilisation des CTL.

Ce système est également utilisable pour la production *in vitro* de cellules effectrices de CTL spécifiques en clinique.

Exemple 3 :

Etude de la médiation de l'adhésion par des complexes CMH/peptide permettant l'enrichissement en lymphocytes T spécifiques d'un antigène.

Matériel et méthodes

- Souris et lignées cellulaires

On utilise des souris DBA/2 et la souris clone 4 (135).

Les hybridomes T 9.4 et B9.1 ont été décrits dans (20) et (136).

La purification de CD8+ a été effectuée selon le protocole MiniMacs (Myltenyi Biotec, Auburn, CA);

- Réactifs et anticorps

Herbimycine A et bioindolylmaléimide IGF 109203X : Calbiochem (Meudon, France)

- anticorps anti-K^d SF1.1.1, anti-CD8, anti-Vβ8 et anti-Vβ10 : Pharmingen (San Diego CA).

- peptides (Cw3 = RYLKNGKETL, HA=IYSTVASSL et T9V = TYQRTRALV) : décrits dans (130), (137), (138) (Neosystem, Strasbourg, France).

- Préparation de la dimérisation de Kd (SC-Kd) monocaténaire et revêtement. On purifie SC-Kd recombinant monocaténaire à partir d'un surnageant de culture de cellules transfectées d'ovaires de hamster chinois (CHO) comme décrit dans (21).

On charge SC-Kd avec les peptides indiqués, selon un rapport molaire de 1/1, et on dimérise en utilisant l'anticorps SF1.1.1 en effectuant une incubation d'une heure à 4°C (SC-Kd/SF1.1.1 : rapport molaire 3/1).

Dans la plupart des cas, les complexes dimérisés sont appliqués sur une plaque 48W (Costar, Brumath, France) à raison de 10 µg/ml, pendant environ 14

h à 4°C. Les sites non liés sont alors saturés avec RPMI 10 % SVF.

- Quantification des cellules adhérentes.

Les cellules sont ajoutées dans les plaques avec les revêtements, centrifugées à 600 tpm et incubées à 37° C pour différentes périodes de temps. Les cellules non adhérentes sont éliminées par 3 lavages avec PBS. Les cellules adhérentes restantes sont incubées avec 150 µl de p-nitrophényl-N-acétyl-β-D glucosaminide (Sigma, Paris, France) à 37°C pendant 2 à 5 heures.

On ajoute ensuite 225 µl de tampon glycine 50 mM, pH 10,4, contenant 5mM de EDTA. On mesure la densité optique DO à 405 nm sur 100 µl de mélange réactionnel avec un lecteur ELISA (Sanofi, Diagnostic Pasteur, France). On estime la fraction de cellules adhérentes à partir d'une courbe standard avec un nombre connu de cellules. En variante, on procède à la quantification en utilisant des cellules marquées ³⁵S- méthionine (Amersham, UK). Les cellules adhérentes sont lysées dans du Triton® 1 % et on mesure la radioactivité en utilisant la formule : pourcentage de cellules adhérentes = cpm de cellules adhérentes/cpm de cellules totales.

Dans quelques expériences, la quantification est effectuée par cytométrie de flux en utilisant des anticorps VB-spécifique.

Résultats

. Induction d'une adhésion spécifique de cellules T par les complexes CMH/peptide dimérisés.

L'hybridome T 9.4, qui reconnaît un peptide dérivé de HLA-Cw3 présenté par K^d, est marqué par incorporation de ³⁵S méthionine et incubé 90 min sur des plaques en plastique revêtues de complexes SC-Kd-peptide ou de complexes dimérisés SC-Kd-peptides (appelés ci-après dKd-peptide), à raison de 10 µg/ml du peptide

indiqué. Après une étape de lavage, on détermine la récupération de cellules en mesurant la radioactivité des cellules adhérentes.

Les résultats obtenus sont donnés sur la figure 5 28 (abscisse:dimérisation de complexes Kd-peptide, ordonnées : % de cellules adhérentes). On constate que 5 % des cellules 9.4 adhèrent sur la surface revêtue de Kd-Cw3. Cette adhésion est faible mais spécifique vis-à-vis du peptide. Lorsque la molécule K^d est dimérisée, on observe jusqu'à 25 % de cellules T ayant adhéré à la surface. 10

Pour étudier le caractère dose-dépendant de l'adhésion spécifique vis-à-vis du peptide de la souche d'hybridomes 9.4, on procède comme suit :

15 - on ajoute les cellules 9.4 (5×10^5) en triplica dans des puits de microtitration p48 revêtus de différentes quantités de dKd-Cw3 (voir figure 29, courbe avec carrés) ou pKd-T9V (voir figure 29, courbe avec cercles). Après 30 min d'incubation à 37° C, on évalue 20 les cellules non adhérentes par la technique à l'hexosaminidase telle que décrite dans la partie matériels et méthodes.

On constate que l'adhésion est spécifique pour un peptide donné et augmente avec la quantité de 25 complexes CMH/peptide dimérisés (figure 29). Pour savoir si un signal de transduction est nécessaire pour l'adhésion cellulaire, les cellules T ont été pré-traitées pendant environ 14 heures avec l'inhibiteur de tyrosine kinase src-spécifique, à savoir de l'herbimycine 30 A et/ou avec l'inhibiteur de protéine kinase C GF109203X (25 μ m) ou du DMSO pendant 15 min à 37°C avant l'essai d'adhésion cellulaire. Le pourcentage de cellules adhérentes est évalué par la technique à l'hexosaminidase. Les résultats obtenus sont donnés sur

la figure 30. On constate dans les deux cas une inhibition significative de l'adhésion spécifique des cellules T. On n'observe aucun effet supplémentaire lorsqu'on utilise les deux inhibiteurs en même temps. Ces observations suggèrent que l'adhésion induite requiert une voie signal impliquant des tyrosines kinases et PKC.

Il apparaît donc que l'adhésion des cellules de l'hybridome 9.4 T est spécifique d'un peptide et dépend de la température et de la dose, augmente lorsque les complexes CMH/peptides sont dimérisés et se trouve partiellement inhibée par les deux inhibiteurs de protéine kinase.

Les complexes CMH/peptides dimérisés, appliqués en revêtement permettent l'enrichissement spécifique en cellules T.

Les résultats donnés ci-après concernent l'étude de l'utilisation de l'adhésion par l'intermédiaire de CMH-peptide pour purifier des cellules T selon leur spécificité.

On prépare un mélange de deux hybridomes de cellules T et on les soumet à incubation comme décrit dans les paragraphes précédents. On évalue l'enrichissement en cellules T spécifiques et le rendement des expériences (à savoir, le nombre absolu de cellules T spécifiques récupérées comparé au nombre de cellules spécifiques du mélange initial).

Etant donné la possibilité, tout au moins théorique, de multiplier les cellules récupérées par voie polyclonale, l'enrichissement a été privilégié par rapport au rendement et des conditions de lavage stringentes ont été utilisées.

On mélange l'hybridome 9.4 (VB10+) spécifique vis-à-vis du complexe Kd-Cw3 selon un rapport de 45 : 55 avec l'hybridome T B9.1 (VB8+) spécifique vis-à-vis du

peptide 102-120 de HEL présenté par I-E^d. Ce mélange (10⁴ cellules) est soumis à incubation sur des surfaces revêtues de dKd-Cw3 ou dKd-HA, on récupère les cellules adhérentes et on les analyse par cytométrie de flux en utilisant des anticorps VB8-spécifique.

Les résultats obtenus sont donnés sur la figure 31. On constate que plus de 88 % des cellules récupérées à partir de la surface dKd-Cw3 expriment VB10 et sont donc des cellules d'hybridome 9.4 Cw3-spécifiques. Moins de 15 cellules sont récupérées sur la surface Kd-HA. Ce procédé a été répété en utilisant un mélange 6:1 constitué par des splénocytes CD8+ purifiés à partir de souris naïves DBA/2 et de splénocytes CD8+ purifiés à partir d'une souris transgénique clone 4 pour un TcR (VB8+) spécifique pour le complexe Kd-HA. Dans la population de départ, 32 % des cellules expriment VB8 et 14 % sont HA-spécifiques (ceci étant dû à la contribution des cellules VB8 provenant de la rate de DBA/2)

Après 14 heures environ d'incubation de ce mélange (10⁴ cellules) sur une surface revêtue de dKd-Cw3 ou dKd-HA, les cellules adhérentes sont analysées par cytométrie de flux. Le pourcentage de cellules T HA-spécifiques (contribution de la souris clone 4) estimé par le rapport du mélange est indiqué entre parenthèses sur la figure 32 qui donne les résultats. Plus de 80 % des cellules récupérées sont VB8 + alors qu'on n'observe aucun enrichissement dans la population récupérée à partir de la surface dKd-Cw3. L'enrichissement obtenu est donc supérieur à 470 %

Ainsi, en utilisant l'adhésion avec médiation de CMH/peptide, il est possible d'enrichir des cellules T spécifiques à partir de populations complexes constituées de cellules d'hybridomes T ou de splénocytes CD8+.

Discussion

Les anticorps dirigés vers les marqueurs de surface se sont révélés utiles pour caractériser et quantifier les cellules lymphoïdes.

5 En utilisant les anticorps immobilisés, un grand nombre de cellules ont été purifiées. Selon l'invention, on a isolé des cellules T selon leur spécificité et à cet effet des complexes recombinants SC-CMH/peptide ont été dimérisés et appliqués sous forme de revêtement sur des supports en plastique.

10 Plusieurs difficultés sont inhérentes à cette stratégie. Tout d'abord les TcR présentent habituellement de faibles affinités intrinsèques pour leurs ligands. De plus, les CMH purifiés à partir de cultures de tissus ou d'organes sont chargés avec un large jeu de self-peptides.

15 L'utilisation de SC-CMH recombinant, qui peut être produit en grande quantité, et chargé de manière homogène avec un peptide synthétique, permet de résoudre ces difficultés. En outre, conformément à l'invention, 20 les complexes dimérisés SC-CMH/peptide ont été appliqués comme revêtement suivant de fortes densités.

Pour déterminer si une cellule T pouvait engager son TcR sur une telle surface, la souche d'hybridome T 9.4 a tout d'abord été utilisée. Il est 25 apparu que l'adhésion de 9.4 était peptide-spécifique et que la dimérisation du complexe CMH/peptide améliorait l'adhésion cellulaire.

De manière avantageuse, la dimérisation apparaît favoriser une orientation correcte du complexe 30 CMH/peptide et/ou augmenter son avidité pour le TcR. En outre, on sait que la dimérisation est nécessaire pour l'activation de cellules T, ce qui peut être critique pour l'adhésion des cellules T. Cette interprétation est renforcée par deux observations : 1) on n'observe aucune

adhésion à 4°C dans les conditions d'expérimentation, 2) l'adhésion est réduite en présence d'inhibiteurs de protéine kinase. De plus, cette interprétation concorde avec des études antérieures montrant que le déclenchement du TcR induit l'activation de plusieurs molécules d'adhésion telles que la B2 intégrine, LFA-1, CD2, CD8 et les B1 intégrine VLAs.

L'engagement du TcR par le complexe antigénique appliqué comme revêtement à faible densité conformément à l'invention a été décrit comme étant CD8-dépendant (139). Cependant la souche d'hybridomes 9.4 utilisée n'exprime pas CD8. En outre, l'anticorps utilisé avec les complexes dimérisés CMH/peptide masque le site d'interaction avec CD8 de K^d.

Le chargement en peptide, de manière homogène, selon une forte densité de SC-Kd dimérisé peut permettre d'éviter l'exigence d'une interaction CD8/CMH.

En conclusion, l'utilisation de molécules CMH recombinantes dans des conditions qui induisent l'activation de cellules T permet de compenser la faible affinité de TcR pour son ligand. L'utilisation selon l'invention de ce système d'adhésion permet d'enrichir des cellules T spécifiques vis-à-vis d'un antigène à partir d'une population cellulaire T complexe.

L'enrichissement spécifique est obtenu aussi bien pour les cellules d'hybridomes T que pour les splénocytes CD8+.

Cette technique permet un enrichissement rapide parmi des millions de cellules et offre donc de nombreuses applications.

Couplé avec l'analyse du répertoire de cellules T, cette technique permet d'identifier les réarrangements de TcR associé à la reconnaissance d'un complexe antigénique donné. On mesurera l'importance d'une telle

information pour contrôler les réponses des cellules T durant une maladie ou pour évaluer des protocoles thérapeutiques.

5 La purification des lymphocytes spécifiques vis-à-vis d'un antigène avant et/ou après une amplification in vitro permet également selon un aspect de grand intérêt de mieux contrôler des immuno-thérapies chez l'homme.

10 **EXEMPLE 4 : ACTIVATION COMPLÈTE DE CELLULES T CD8+ NAÏVES EN L'ABSENCE DE CO-STIMULATION**

MATERIEL ET METHODES

15 **Souris**

Des souris transgéniques pour le TCR clone 4 ont été nourries et entretenues à l'Institut Pasteur. Pour les expériences témoin qui ont utilisé des souris transgéniques pour le TCR clone 4 dans un contexte H-2^b (souris transgéniques clone 4 TCR/B6), les souris transgéniques ont été re-croisées pendant 7 générations avec des souris C57BL/6 et la présence du transgène ainsi que de H-2^b a été confirmée par analyse FACS.

25

Peptides

Les peptides HA (IYSTVASLL) et CW3 (RYLKNGKETL) ont été décrits précédemment (140, 141) et ont été obtenus auprès de Neosystem SA (Strasbourg, France).

30

Lignée cellulaire et anticorps monoclonaux.

La lignée cellulaire P815 (H-2^d ; TIB64, American Type Culture Collection, Rockville, MD) a été maintenue sur un milieu RPMI 1640 complémenté avec 10% de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur. L'anticorps monoclonal SF-1.1.1. (HB158) a été obtenu auprès de American Type Culture Collection, Rockville, MD. Les anticorps utilisés pour les analyses FACS ont été achetés auprès de PharMingen, San Diego, CA (anti-CD69, anti-B220 et anti-CD62L), CALTAG Labs, San Francisco, CA (anti-CD4 L3/T4, anti-CD8 Ly-2, anti-CD25 récepteur de IL-2, anti-CD44 et anti-Vβ8.1/8.2) ou auprès de Serotec, Oxford, Grande-Bretagne (anti-macrophage F4/80). La protéine de fusion CTLA4-Ig a été fournie par Dr. P. Linsley (Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute, Seattle, WA).

Revêtement de SC-Kd

K^d simple chaîne (SC-Kd) a été préparé et chargé avec soit HA, soit CW3 comme décrit précédemment (21). Des plaques à 96 puits à fond plat (TPP, Trasadingen, Suisse) ont été couvertes pendant 2 h à 37°C avec différentes concentrations d'anticorps SF1-1.1.1, lavées deux fois, saturées dans du SFV à 50% et lavées deux fois. SC-Kd/HA ou SC-Kd/CW3 (en une quantité égale à deux fois la quantité stoechiométrique de SF1-1.1.1) a été ajouté pendant deux heures à 37°C et les plaques ont été finalement lavées deux fois avant utilisation.

Purification de splénocytes CD8⁺

La sélection positive de cellules T CD8⁺ à partir des splénocytes totaux de souris transgéniques a été réalisée

par coloration magnétique indirecte. Brièvement, 10^8 splénocytes ont été débarassés des globules rouges, puis traitées avec un anticorps antiCD8 purifié (PharMingen, San Diego, CA) pendant 45 minutes à 4°C. Après lavage, des microbilles magnétiques couplées chèvre anti-rat (Myltenyi Biotec, Auburn, CA) ont été ajoutées pendant 15 minutes à 4°C. Les splénocytes ont été à nouveau lavés et finalement séparés par chromatographie sur une colonne attachée à un magnétique. La population purifiée contient en général plus de 98,5% de splénocytes CD8⁺, comme le révèle l'analyse FACS.

Test de prolifération des cellules T.

Les cellules T purifiées issues de rates de souris transgéniques clone 4 (10^5 cellules par puits, sauf mention contraire) ont été ajoutées aux puits revêtus par SC-Kd/HA ou SC-Kd/CW3. De la thymidine ³H a été ajoutée après 24 heures de culture et l'incorporation radioactive a été mesurée après 16 autres heures. Dans certaines expériences, de l'IL-2 (IL-2 recombinante humaine, Immugenex Corp., Los Angeles, CA) a été ajoutée au début de la stimulation.

Induction de CTL

Des splénocytes CD8⁺ purifiés issus de rates de souris transgéniques clone 4 ($3 \cdot 10^6$ cellules) ont été ajoutées aux plaques à 96 puits couvertes par 2 µg/ml de SC-Kd/HA et ont été incubés à 37°C pendant trois jours en l'absence d'IL-2 exogène, et en présence du peptide compétiteur CW3 à 50 µg/ml. Les cellules ont alors été rassemblées et les cellules viables ont été comptées par exclusion au bleu trypan. L'activité cytotoxique des

cellules a été testée sur des cellules cible P815 marquées au ^{51}Cr pulsées avec soit HA, soit CW3 tel que décrit précédemment (142).

5 Détermination de cytokines

Des splénocytes purifiés CD8+ (10^5 puits) ont été ajoutés à des plaques à 96 puits revêtus de 2 $\mu\text{g/ml}$ de SC-Kd/HA en présence de peptide compétiteur CW3 (50 $\mu\text{g/ml}$), ou de 20 $\mu\text{g/ml}$ de SC-Kd/CW3 Dans les 2 cas, on
10 n'ajoute pas de IL-2 exogène

Les surnageants de culture sont collectés à différents moments après stimulation La production de TNF a été mesurée par bioessai en utilisant la lignée WEHI-279 comme indicateur. On a mesuré la production de IFN- γ ,
15 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10 et GM-CSF dans les surnageants de culture par test ELISA analysé par cytométrie

10^5 splénocytes CD8+ purifiés/puits ont été colorés avec différents anticorps conjugués, pendant 30 min sur
20 de la glace en tampon FACS (2% SVF, 0,01 % azoture de Na dans PBS). Les cellules mortes ont été colorées avec de l'iodure de propidium (Sigma Chemical Co - St Louis, MO). Les données sur les cellules viables ont été obtenues et analysées sur FACScan en utilisant le logiciel Cellquest
25 (Becton Dickinson, San Jose, CA)

RESULTATS

30 Une réponse proliférative est élicitée par des complexes recouverts SC-Kd/HA seuls.

Des molécules SC-Kd ont été chargées avec le peptide HA et utilisées pour couvrir des plaques plastiques par l'intermédiaire de l'anticorps K^d-spécifique SF1-1.1.1.

Cet anticorps, qui reconnaît un épitope dans le domaine $\alpha 3$, a été précédemment utilisé pour générer des dimères avec une topologie compatible avec l'activation de cellules T. Les cellules T CD8⁺ ont été purifiées à partir des splénocytes totaux de souris transgéniques clone 4 en utilisant un anticorps CD8-spécifique et des billes magnétiques comme décrit ci-dessus. Cette procédure donne de manière reproductible une pureté de cellules supérieure à 98,5% en cellules T CD8⁺.

En réponse aux complexes recouverts SC-Kd/HA, les splénocytes CD8⁺ clone 4 purifiés prolifèrent d'une manière dose-dépendante. Les résultats sont illustrés par la figure 33 (en abscisse, SC-Kd/HA recouverts en microgrammes/ml ; en ordonnée, prolifération des cellules T en cpm X 10⁻³). La figure 33 montre que les complexes recouverts SC-Kd/HA induisent la prolifération de cellules CD8⁺ purifiées. Des splénocytes CD8⁺ purifiés (10⁵ / puits) ont été incubés sur des plaques couvertes par les concentrations indiquées de complexes SC-Kd/HA en présence (carré blanc) ou en absence (carré noir) de 10 U / ml de IL-2 recombinante humaine. Après 24 heures à 37°C, les cellules ont été activées avec de la thymidine ³H pendant 16 heures. Sont également représentées les proliférations induites par une lectine (en utilisant Con A à 5 µg/ml, cercle noir) ainsi qu'une ionophore PMA/calcium (10 ng/ml et 250 ng/ml, cercle blanc), ou en réponse à 20 µg/ml de SC-Kd/CW3 (triangle blanc) en l'absence de IL-2. Les données représentent la moyenne de trois répétitions, et sont représentatives de plus de 8 expériences.

De manière intéressante, l'addition d'IL-2 exogène n'a pas été nécessaire et n'a eu aucun effet sur la prolifération mesurée. Les splénocytes CD8⁺ purifiés ont également proliféré à un niveau comparable à celui observé avec les complexes SC-Kd/HA, en réponse à la Con A ou à un mélange ionophore PMA/calcium. La concentration de SC-Kd/HA requise pour que la réponse des cellules T soit à 50% de son maximum a été de 0,5 à 0,6 µg/ml, que l'IL-2 exogène soit présente ou absente. Cette prolifération est peptide-spécifique puisque SC-Kd chargé avec un peptide inapproprié CW3 n'a réussi à provoquer aucune prolifération de cellules T. Les résultats sont présentés en figure 34A.

La figure 34 montre que les réponses prolifératives de cellules CD8⁺ dépendent d'un stimulus SC-Kd/HA et ne nécessitent pas une interaction CD28/B7. Les splénocytes CD8⁺ purifiés (10^5 / puits de l'haplotype H-2^d ou $2,5 \times 10^5$ / puits de l'haplotype H-2^b) ont été incubés sur des plaques couvertes avec les composés indiqués pendant 24 heures à 37°C en l'absence d'IL-2 humaine recombinante. Les cellules ont été pulsées avec de la thymidine ³H pendant les 16 heures suivantes. Les données représentent la moyenne de trois répétitions et sont exprimées en pourcentage de prolifération induite par lectine (en utilisant ConA à 5 µg/ml). En figure 34A, les plaques ont été recouvertes par 2µg/ml de SC-Kd/HA, 40 ng/ml de peptides HA, 20 µg/ml de SC-Kd/CW3, 2 µg/ml SF1-1.1.1, et le compétiteur (peptides CW3) a été ajouté à 50 µg/ml.

Ces données indiquent que les molécules du CMH de classe I recouvertes sont capables d'induire la prolifération de splénocytes CD8⁺ naïfs purifiés d'une manière peptide-spécifique.

La procédure de purification n'active pas les splénocytes CD8⁺

- 5 De manière à vérifier que les splénocytes CD8⁺ clone 4 purifiés présentent un phénotype naïf, la distribution des tailles cellulaires et l'expression de CD69, CD25, CD62L et CD44 ont été analysées par cytométrie de flux après purification. Les résultats sont illustrés par la
- 10 figure 35 qui montre que les splénocytes CD8⁺ présentent un phénotype activé après stimulation par SC-Kd/HA. 10⁵ splénocytes CD8⁺ par puits ont été incubés dans des plaques avec du PBS pendant 16 heures (jour 0) ou dans des plaques couvertes par 20 µg/ml de SC-Kd/HA pendant
- 15 trois jours (jour 3) à la fois en absence d'IL-2 recombinante et en présence de compétiteurs (voir figure 34). Les cellules vivantes ont été choisies par rapport à CD8⁺. La taille des cellules (dispersion avant) et le phénotype de surface des cellules ont été testés.
- 20 L'expression de CD69, CD62L, CD25 et CD44 par les splénocytes CD8⁺ amorcés et non amorcés a été mesurée par cytométrie de flux en utilisant l'anticorps correspondant. Les résultats indiqués sont les résultats pour une souris représentative parmi un minimum de 3.
- 25 Comme le montre la figure 35 (jour 0), plus de 85% des cellules T purifiées sont petites, CD69⁻, CD62 L⁺ CD25⁻ et faiblement CD44. Ces figures ne peuvent être différenciées de celles des splénocytes clone 4 non purifiés qui ont indiqué que la procédure de purification
- 30 ne modifie pas le niveau d'activation des cellules T.

De manière à confirmer que la procédure de purification choisie n'intervenait pas dans la prolifération subséquente induite avec SC-Kd/HA, on a purifié

« négativement » des cellules T CD8⁺ clone 4 en utilisant des anticorps dirigés contre des cellules B (B220), CD4⁺ (L3T4) et macrophages (F4/80) pour éliminer ces cellules des splénocytes transgéniques. Il faut noter que cette

5 . procédure ne peut pas modifier les cellules purifiées puisqu'aucun des anticorps utilisés ne réagissent avec les cellules T CD8⁺. Ces splénocytes clone 4 purifiés « négativement » ont alors été utilisés dans le même test

10 d'une manière similaire à leurs contreparties purifiées « positivement ». Les résultats sont présentés en figure 34C. Les splénocytes CD8⁺ purifiés (10^5 /puits de l'haplotype H-2d ou $2,5 \times 10^5$ /puits de l'haplotype H-2b) ont été incubés dans des plaques couvertes avec 2 µg/ml

15 de SC-Kd/HA ou 20 µg/ml de SC-Kd/CW3, pendant 24 heures à 37°C en absence d'IL-2 humaine recombinante. Les cellules ont été pulsées avec de la thymidine ³H pendant les 16 heures suivantes. Les données représentent la moyenne de trois répétitions et sont exprimées en pourcentage de

20 prolifération induite par lectine (en utilisant ConA à 5 µg/ml). Les expériences impliquant une activation par SC-Kd/HA ont été réalisées en présence du peptide compétiteur CW3 (50 µg/ml). Cependant, comme le niveau de pureté et le rendement ont été plus faibles que ceux

25 obtenus pour les cellules T sélectionnées « positivement », la purification « positive » a été choisie pour les expériences suivantes.

30 La prolifération induite par SC-Kd/HA ne requiert pas l'interaction CD28/B7

Les cellules T CD8⁺ utilisées dans ces expériences ont été hautement purifiées. De manière à exclure le fait qu'un petit nombre de molécules contaminantes APC ou B7

potentiellement exprimées sur les cellules T puisse fournir une co-stimulation, les expériences additionnelles suivantes ont été réalisées. CD28 est la molécule costimulatrice la plus puissante exprimée sur les cellules T. CTLA4-Ig, une protéine de fusion comprenant le domaine extracellulaire de l'homologue CD28 CTLA-4 et la portion Fc d'une immunoglobuline humaine, se lie à B7.1 et B7.2 avec une haute affinité (143) et a été utilisée à la fois in vivo et in vitro en tant que leurre pour bloquer l'interaction CD28/B7 (143, 145). Pour déterminer si l'interaction CD28/B7 joue un rôle dans la prolifération de splénocytes CD8⁺ clone 4 naïfs purifiés par l'intermédiaire de SC-Kd/HA, le test de prolifération a été réalisé en présence de 10 µg/ml de CTLA4-Ig. (Des expériences préliminaires ont indiqué que, tel que reporté précédemment (143), cette concentration est suffisante pour inhiber complètement une réaction de lymphocytes mixtes allogéniques primaires de 10⁵ splénocytes d'une souris C57BL/6 induite par 10⁵ splénocytes irradiés d'une souris DBA/2). Les résultats sont présentés en figure 34B. Les splénocytes CD8⁺ purifiés (10⁵/ puits de l'haplotype H-2^d ou 2,5 X 10⁵ / puits de l'haplotype H-2^b) ont été incubés sur des plaques couvertes avec 2 µg/ml de SC-Kd/HA avec ou sans protéine de fusion CTLA4-Ig (10 µg/ml), pendant 24 heures à 37°C en l'absence d'IL-2 humaine recombinante. Les cellules ont été pulsées avec de la thymidine ³H pendant les 16 heures suivantes. Les données représentent la moyenne de trois répétitions et sont exprimées en pourcentage de prolifération induite par lectine (en utilisant ConA à 5 µg/ml). Les expériences impliquant une activation par SC-Kd/HA ont été réalisées en présence du peptide compétiteur CW3 (50 µg/ml). Comme le montre la figure 34B et comme il est attendu lorsque le seul

stimulus fourni aux cellules T est des complexes SC-Kd/HA, CTLA4-Ig n'a eu aucun effet sur la prolifération des splénocytes CD8⁺ clone 4.

- 5 **La prolifération induite par SC-Kd/HA ne requiert pas une interaction de cellule à cellule.**

De manière à mieux déterminer le rôle des interactions de cellule à cellule dans la prolifération de splénocytes CD8⁺ clone 4 naïfs, l'effet d'une diminution de la densité cellulaire tout en maintenant la concentration de SC-Kd/HA constante a été étudié. Des complexes SC-Kd/HA (20 µg/ml) ont été couverts et des dilutions en série de splénocytes CD8⁺ clone 4 purifiés ont été inoculés à raison de $1,5 \times 10^3$ à $1,5 \times 10^5$ cellules par ml. Les résultats sont présentés en figure 36 (en abscisse, nombre de cellules $\times 10^{-4}$; en ordonnée, la prolifération des cellules T en cpm $\times 10^{-3}$) qui montre que la réponse proliférative à SC-Kd/HA est proportionnelle au nombre de splénocytes CD8⁺. De $1,5 \times 10^3$ à $1,5 \times 10^5$ splénocytes CD8⁺ par ml ont été ajoutés à des plaques couvertes avec 20 µg/ml de SC-Kd/HA, en absence d'IL-2 humaine recombinante, et en présence de compétiteurs (voir figure 34). Après 24 heures à 37°C, les cellules ont été pulsées avec la thymidine ³H pendant 16 heures. Les données représentent la réponse moyenne de trois répétitions. Comme le montre la figure 36, une relation parfaitement linéaire est observée entre le nombre de cellules T inoculées et la prolifération mesurée sur toute la gamme, ce qui suggère qu'aucune interaction de cellule à cellule n'est requise pour que les cellules T prolifèrent.

Les complexes SC-Kd/HA sont en effet le stimulus activateur reçu par les splénocytes CD8⁺ clone 4.

Des peptides immunogéniques liés à des molécules du CMH
présentent généralement de faibles taux de dissociation.
On ne peut cependant pas complètement exclure que durant
5 la période d'incubation, quelques peptides puissent se
dissocier du SC-Kd recouvert et se lier à des molécules
K^d vides exprimées par des cellules T CD8⁺. De manière à
démontrer que les complexes SC-K^d/HA recouverts sur des
plaques plastiques sont en fait le stimulus activateur
10 reçu par les splénocytes CD8⁺ clone 4 naïfs purifiés,
trois expériences additionnelles ont été réalisées.
Tout d'abord, la réponse de cellules T purifiées au
peptide seul a été examinée. Les résultats sont illustrés
sur la figure 34A (voir ci-dessus). Il a été trouvé que
15 les splénocytes CD8⁺ clone 4 purifiés ne prolifèrent pas
lorsque 40 ng de peptides sont ajoutés, ce qui correspond
à la quantité totale de peptides contenus dans environ 2
µg de complexes SC-Kd/HA. Ce résultat indique que même si
tous les SC-Kd/HA recouverts se dissociaient et si les
20 peptides relachés se liaient aux molécules K^d exprimés à
la surface cellulaire, ceci ne serait pas suffisant pour
expliquer la prolifération observée de splénocytes CD8⁺
clone 4 purifiés.
Deuxièmement, alors que les splénocytes clone 4 non
25 purifiés ont proliféré en réponse au peptide seul du fait
de la présence d'APC professionnelles dans la population
brute de splénocytes, cette prolifération a été bloquée
par un excès de peptide inapproprié. Nous avons donc
cherché à déterminer si le même excès de peptide
30 inapproprié avait un quelconque effet sur la
prolifération de splénocytes CD8⁺ clone 4 purifiés
induite par SC-Kd/HA. Comme illustré par la figure 34A,
un excès dans un facteur de 1 250 du peptide inapproprié
CW3, qui inhibait la prolifération de splénocytes non

purifiés induite par 40 ng/ml de HA, n'a aucun effet sur la prolifération de splénocytes CD8⁺ clone 4 purifiés induite par SC-Kd/HA recouvert. Toutes les expériences ont donc été réalisées en présence de 50 µg/ml de peptide CW3.

Enfin, la souris transgénique clone 4 a été croisée sur un haplotype H-2^b, comme décrit dans la section Matériel et Méthodes de cet exemple. De manière intéressante, bien que le TCR transgénique clone 4 soit restreint par K^d, quelques cellules T HA-réactives ont été positivement sélectionnées dans le contexte H-2^b. Des splénocytes CD8⁺ issus de ces souris ont été purifiés et leur prolifération induite par SC-Kd/HA recouvert a été testée comme décrit ci-dessus. Comme illustré par la figure 34C, ces splénocytes transgéniques CD8⁺ H-2^b ont proliféré en réponse à SC-Kd/HA recouvert, bien que le niveau de prolifération ait été quelque peu inférieur à celui obtenu avec des cellules purifiées à partir de souris transgéniques clone 4 H-2^d. Cette plus faible prolifération reflète le fait que seulement une fraction des cellules a répondu au stimulus puisque une régulation amont de CD69 n'a été détectée que sur 10% des splénocytes CD8⁺ H-2^b à 24 heures. La prolifération de splénocytes transgéniques clone 4 H-2^b était peptide-spécifique puisque SC-Kd/CW3 n'a pas induit de prolifération (voir figure 34C).

Pris ensemble, ces résultats indiquent que la prolifération observée n'était pas due à la libération du peptide HA à partir des complexes SC-Kd/HA recouvert et à sa liaison à des molécules K^d exprimées sur des cellules. Ce sont en effet les complexes SC-Kd/HA qui sont le stimulus activateur reçu par les splénocytes CD8⁺ clone 4.

Les splénocytes CD8⁺ clone 4 stimulés par des complexes SC-Kd/HA présentent un phénotype activé.

De manière à déterminer si la prolifération de
5 splénocytes CD8⁺ clone 4 stimulée par des complexes SC-Kd/HA est associée à un phénotype activé, l'expression de plusieurs marqueurs d'activation a été analysée par cytométrie de flux (voir la figure 35). Comme mentionné
10 ci-avant, après purification, les splénocytes CD8⁺ clone 4 sont CD69⁻, CD25⁻, faiblement CD44, fortement CD62L et de petite taille, ce qui indique un phénotype naïf (voir figure 35, jour 0). Après que les cellules aient été stimulées pendant trois jours par des complexes SC-Kd HA recouverts en l'absence d'IL-2 ajouté, la transformation
15 en blastes a été observée pour 90% des cellules. L'expression de CD69 et CD25 a été détectée dans respectivement 94% et 93% des cellules. L'expression de CD44 était régulée en amont de faible à fort et l'expression de CD62L a diminué dans environ 20% des
20 cellules (voir figure 35 jour 3). En fait, 16 heures de stimulation furent suffisantes pour observer une régulation amont de CD69 dans 90% des cellules activées. Inversement, les expériences de cinétique ont indiqué que huit jours étaient nécessaires pour observer une
25 modulation négative de CD62-L dans plus de 80% des cellules. Ces résultats démontrent que (i) après purification les splénocytes CD8⁺ clone 4 présentent un phénotype naïf, (ii) les complexes SC-Kd/HA recouverts stimulent la grande majorité des cellules pour présenter
30 un phénotype complètement activé.

Les splénocytes CD8⁺ clone 4 stimulés par des complexes SC-Kd/HA recouverts sécrètent des cytokines.

- 5 Nous avons ensuite déterminé si la prolifération et l'activation de splénocytes CD8⁺ clone 4 étaient associées à une différenciation en effecteurs. La production de différentes cytokines a été mesurée après stimulation à l'aide de complexes SC-Kd.HA, sans addition
10 d'IL-2 exogène, et en présence d'un excès de peptides CW3. Les résultats sont présentés dans le tableau 1 suivant :

TABLEAU 14:

Production de cytokines par des splénocytes CD8⁺ activés par SC-Kd/HA

5

10

15

	Jour 0	Jour 1	Jour 3	
		SC-Kd/HA	SC-Kd/CW3	SC-Kd/HA
TNF (fg/ml)*	<0,4	4.44 (0,10)	<0,4	17.30 (0,96)
IFN- γ (ng/ml)	<0,037	1.19 (0,65)	<0,037	64,59 (11,60)
IL-3 (ng/ml)	<0,02	0,08 (0,01)	<0,02	1,41 (0,18)
GM-CSF (ng/ml)	<0,024	6,48 (2,42)	<0,024	23.28 (3,28)

20

25

* Moyenne (déviatiOn standard) de la concentration en cytokine dans le surnageant de 10⁵ splénocytes CD8⁺ purifiés activés avec le complexe SC-Kd/peptide indiqué.

30

Les productions de IFN- γ et de IL-3 ont toutes deux été détectées après 24 heures et ont augmenté au jour 3 (voir tableau 1, lignes 2 et 3), alors que celles de GM-CSF et de TNF étaient plus précoces ; et également augmentaient au cours du temps (voir tableau 1, lignes 1 et 4). La production de cytokines était peptide-spécifique puisque il n'y a pas eu de cytokines détectées lorsque les cellules ont été incubées en présence de SC-Kd chargé avec un peptide inapproprié (voir tableau 3 colonne relative à CW3). Des splénocytes CD8⁺ naïfs (immédiatement après purification) n'ont pas produit de quantités détectables de ces cytokines (tableau 1, jour 0). Il n'a pas été possible de détecter une quelconque production d'IL-2, IL-4, IL-6 ou IL-10 dans le surnageant de cellules activées par SC-Kd/HA.

La stimulation de CD8⁺ par des complexes SC-Kd/HA recouverts induit une activité cytotoxique.

De manière à mieux caractériser les blastes de cellules T CD8⁺ clone 4 obtenus après stimulation par SC-Kd/HA recouvert, l'activité cytotoxique a été mesurée. Des splénocytes CD8⁺ clone 4 purifiés ont été activés pendant trois jours en l'absence d'IL-2 exogène et en présence d'un excès de CW3. Les cellules activées ont été incubées pendant 6 heures avec des cellules P815 marquées au ⁵¹Cr pulsées avec HA à différents ratio effecteur : cellule cible. Les résultats sont présentés en figure 37 (en abscisse, ratio effecteur : cellule cible ; en ordonnée, pourcentage de lyse spécifique).

La figure 37 illustre le fait que les splénocytes CD8⁺ activés par SC-Kd/HA élicitent une réponse cytotoxique. Des splénocytes CD8⁺ purifiés (3×10^6) ont été utilisés

immédiatement après purification (jour 0) ou ont été incubés dans des plaques couvertes avec 2 mg/ml de SC-Kd/HA pendant trois jours (jour 3) à 37°C, en l'absence d'IL-2 humaine recombinante et en présence de compétiteur (voir figure 34). L'activité cytotoxique primaire (mesurée par test de libération de ⁵¹Cr comme décrit dans la section Matériel et Méthode de cet exemple) a été testée sur des cellules cibles P815 pulsées (symboles noirs) et non pulsées (symboles blancs) par le peptide HA (jour 0, symbole = cercle ; jour 3, symbole = carré). Comme illustré par la figure 37, alors qu'aucune activité cytotoxique n'a été détectée immédiatement après purification (voir figure 37, jour 0), une lyse significative a été observée avec les cellules T CD8⁺ clone 4 activées pendant 3 jours. Cette lyse était peptide-spécifique puisque les cellules P815 pulsées par le peptide inapproprié CW3 n'ont pas été lysées (voir figure 37, jour 0 et jour 3, - HA).

La présente invention n'est d'aucune manière limitée aux exemples spécifiques contenus dans le présent mémoire descriptif. Les revendications annexés, dont l'objet peut être obtenu et utilisé par l'homme du métier en se basant sur la présente description, fournit d'autres exemples de l'objet considéré par l'invention. D'autres modes de réalisation peuvent être déduits du contenu de la présente description, conjointement avec la compréhension de l'homme du métier, par exemple les enseignements que l'on trouve dans les documents référencés ci-après.

L'invention comprend spécifiquement, comme décrit ici et comme il apparaît clairement à l'homme du métier : les molécules recombinantes ; les molécules recombinantes

5 en association avec un peptide approprié, ou ce qu'on appelle également le complexe CMH/peptide ; les complexes CMH/peptide sous les formes monomère, dimère, polymère et en agrégats ; les méthodes et procédés destinés à
10 détecter et produire des lymphocytes antigène-spécifiques utilisant l'une quelconque des molécules recombinantes mentionnées ci-dessus ; des kits de diagnostic impliquant l'utilisation des molécules recombinantes mentionnées ci-dessus ; des méthodes utilisant des lymphocytes générés
15 par mise en contact des complexes CMH/peptide avec diverses cellules appropriées ; et des méthodes permettant d'influencer l'activité ou la fonction d'un lymphocyte en le mettant en contact avec un complexe CMH/peptide sous différentes formes. La forme monomère du complexe CMH/peptide est particulièrement utile pour anergiser des lymphocytes et la forme dimère est particulièrement utile pour générer un CTL.

20 Ces résultats montrent donc que des molécules CMH recombinantes, monocaténaires, couplées, à densité élevée, sur des billes, sont capables d'activer de manière efficace des CTL primaires et que ces CTL, lorsque la comparaison est possible, des caractéristiques similaires à celles des CTL produits in vivo par immunisation.

25

L'homme du métier peut consulter les documents suivants pour mettre en pratique l'invention ou mieux comprendre le contexte. Ces documents sont également pertinents dans leurs enseignements spécifiques auxquels il est fait référence dans la description.

1. Townsend, A., Bodmer, H. 1989. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 7:601-624.
2. Kronenberg, M., G. Siu, L. Hood, and N. Shastri. 1986. The molecular genetics of T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 4:529-591.
3. Pannetier, C., S. Delassus, S. Darche, C. Saucier, and P. Kourilsky. 1993. Quantitative titration of nucleic acids by enzymatic amplification reactions run to saturation. *Nucleic Acids Res* 21, no. 3:577-83.
4. Pannetier, C., J. Even, and P. Kourilsky. 1995. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today* 16, no. 4:176-81.
5. Casanova, J.L., P. Romero, C. Widmann, P. Kourilsky, and J.L. Maryanski. 1991. T cell receptor genes in a series of class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocyte clones specific for a *Plasmodium berghei* nonapeptide: implications for T cell allelic exclusion and antigen-specific repertoire. *J Exp Med* 174, no. 6:1371-83.
6. Anichini, A., G. Fossati, and G. Parmiani. 1985. Clonal analysis of cytotoxic T-lymphocyte response to autologous human metastatic melanoma. *Int J Cancer* 35, no. 5:683-9.
7. Rosenberg, S.A. 1992. Karnofsky Memorial Lecture. The immunotherapy and gene therapy of cancer. *J Clin Oncol* 10, no. 2:180-99.
8. Ratto, G.B., G. Melioli, P. Zino, C. Mereu, S. Mirabelli, G. Fantino, M. Ponte, P. Minuti, A. Verna, P. Noceti, and et al. 1995. Immunotherapy with the use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 as adjuvant treatment in stage III non-small-cell lung cancer. A pilot study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 109, no. 6:1212-7.
9. Ravaud, A., E. Legrand, M.M. Delaunay, E. Bussieres, V. Coulon, L. Cany, S. Huet, D. Verdier, M. Kind, F. Chomy, and et al. 1995. A phase I trial of repeated tumour-infiltrating lymphocyte (TIL) infusion in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 71, no. 2:331-6.
10. Fisher, B., B.S. Packard, E.J. Read, J.A. Carrasquillo, C.S. Carter, S.L. Topalian, J.C. Yang, P. Yolles, S.M. Larson, and S.A. Rosenberg. 1989. Tumor localization of adoptively transferred indium-111 labeled tumor infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 7, no. 2:250-61.
11. Casanova, J.-L., J.-C. Cerottini, M. Matthes, A. Necker, H. Gournier, C. Barra, C. Widmann, H. MacDonald, F. Lemonnier, B. Malissen, and J. Maryanski. 1992. H-2-restricted CTL specific for HLA display TcR limited diversity. *J. Exp. Med.* 176:439-448.

12. MacDonald, H.R., J.L. Casanova, J.L. Maryanski, and J.C. Cerottini. 1993. Oligoclonal expansion of major histocompatibility complex class I-restricted cytolytic T lymphocytes during a primary immune response in vivo: direct monitoring by flow cytometry and polymerase chain reaction. *J Exp Med* 177, no. 5:1487-92.
13. Walker, P., T. Ohteki, J. Lopez, H. MacDonald, and J. Maryanski. 1995. Distinct Phenotypes of Antigen-Selected CD8 T Cells Emerge at Different Stages of an in Vivo Immune Response. *J Immunol* 155:3443-3452.
14. Pannetier, C., M. Cochet, S. Darche, A. Casrouge, M. Zoller, and P. Kourilsky. 1993. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, no. 9:4319-23.
15. Langlade-Demoyen, P., J.-P. Levraud, P. Kourilsky, and J.-P. Abastado. 1994. Primary CTL induction using peptide stripped autologous cells. *Int. Immunol.* 6:1759-1766.
16. Abastado, J.-P., D. Ojcius, A. Casrouge, P. Yeh, T. Schumacher, H. Ploegh, and P. Kourilsky. 1993. A soluble, single-chain Kd molecule produced by yeast selects a peptide repertoire indistinguishable from that of cell surface-associated Kd. *Eur. J. Immunol.* 23:1776-1783.
17. Murre, C., E. Choi, J. Weis, J.G. Seidman, K. Ozato, L. Liu, S.J. Burakoff, and C.S. Reiss, 1984. Dissection of serological and cytolytic T lymphocyte epitopes on murine major histocompatibility antigens by a recombinant H-2 gene separating the first two external domains. *J. Exp Med* 160, no. 1:167-78.
18. Maryanski, J., R. Accolla, and B. Jordan. 1986. H-2 restricted recognition of cloned HLA class I gene products expressed in mouse cells. *J. Immunol.* 136:4340.
19. Sibille, C., P. Chomez, C. Wilmann, A. van Pel, E. de Plaen, J. Maryanski, V. de Bergeyck, and T. Boon. 1990. Structure of the gene of tumor transplantation antigen P198: a point mutation generates a new antigenic peptide. *J. Exp. Med.* 172:35-45.
20. Bellio, M., Y.-C. Lone, O. de la Calle-Martin, B. Malissen, J.-P. Abastado, and P. Kourilsky. 1994. The V β CDR1 region of an MHC Class I-restricted TCR is involved in the recognition of peptide/MHC I and superantigen MHC II complex. *J. Exp. Med.* 179:1087-1097.
21. Abastado, J.P., Y.C. Lone, A. Casrouge, G. Boulot, and P. Kourilsky. 1995. Dimerization of soluble MHC-peptide complexes is sufficient for activation of T-cell hybridoma and induction of unresponsiveness. *J. Exp. Med.* 182, 439-47.
22. Matsumura, M., Y. Saito, M.R. Jackson, E.S. Song, and P.A. Peterson. 1992. In vitro peptide binding to soluble empty class I major histocompatibility complex molecules isolated from transfected *Drosophila melanogaster* cells. *J. Biol. Chem.* 267, No. 33:23589-95.
23. Mottez, E., C. Jualin, F. Godeau, J. Choppin, J.-P. Levy, and P. Kourilsky. 1991. A single-chain murine class I major transplantation antigen. *Eur. J. Immunol.* 21:467-471.
24. Lone, Y.C., M. Bellio, A. Prochnicka-Chalufour, D.M. Ojcius, N. Boissel, T.H. Ottenhoff, R.D. Klausner, J.P. Abastado, and P. Kourilsky. 1994. Role

- of the CDR1 region of the TCR beta chain in the binding to purified MHC-peptide complex. *Int. Immunol.* 6, no. 10:1561-5.
25. Uyttenhove, C., J. Maryanski, and T. Boon. 1983. Escape of mouse mastocytoma P815 after nearly complete rejection is due to antigen-loss variants rather than immunosuppression. *J. Exp. Med.* 157, no. 3:1040-52.
 26. Brichard, V.G., G. Warnier, A. Van Pel, G. Morlighem, S. Lucas, and T. Boon. 1995. Individual differences in the orientation of the cytolytic T cell response against mouse tumor P815. *Eur. J. Immunol.* no. 3:664-71.
 27. Fink, P.J., L.A. Matis, D.L. McElligott, M. Bookman, and S.M. Hedrick. 1986. Correlations between T-cell specificity and the structure of the antigen receptor. *Nature* 321, no. 6067:219-26.
 28. Winoto, A., J.L. Urban, N.C. Lan, J. Gorman, L. Hood, and D. Hansburg. 1986. Predominant use of a V alpha gene segment in mouse T-cell receptors for cytochrome c. *Nature* 324, no. 6098:679-82.
 29. Pullen, A.M., P. Marrack, and J.W. Kappler. 1988. The T-cell repertoire is heavily influenced by tolerance to polymorphic self-antigens. *Nature* 335, no. 6193:796:801.
 30. Okada, C.Y., and I.L. Weissman. 1989. Relative V beta transcript levels in thymus and peripheral lymphoid tissues from various mouse strains. Inverse correlation of I-E and Mls expression with relative abundance of several V beta transcripts in peripheral lymphoid tissues. *J. Exp. Med.* 169, no. 5:1703:-19.
 31. Marguerie, C., C. Lunardi, and A. So. 1992 PCR-based analysis of the TCR repertoire in human autoimmune diseases. *Immunol. Today* 13, no. 9:336-8.
 32. Panzara, M.A. J.R. Oksenberg, and L. Steinman. 1992. The polymerase chain reaction for detection of T-cell antigen receptor expression. *Curr. Opin. Immunol.* 4, no. 2:205-10.
 33. Davis, M.M., M. McHeyzer-Williams, and Y.H. Chien. 1995. T-cell receptor V-region usage and antigen specificity. The cytochrome c model system. *Ann N.Y.Acad. Sci.* 756:1-11.
 34. Lanier, L.L., E.G. Engleman, P. Gatenby, G.F. Babcock, N.L. Warner, and L.A. Herzenberg. 1983. Correlation of functional properties of human lymphoid cell subsets and surface marker phenotypes using multiparameter analysis and flow cytometry. *Immunol. Rev.* 74: 143-60.
 35. Karjalainen, K. 1994. High sensitivity, low affinity--paradox of T-cell receptor recognition. *Curr. Opin. Immunol.* 6, no. 1:9-12.
 36. Corr, M., A. Slanetz, L. Boyd, M. Jelonek, S. Khilko, B. Al-Ramadi, Y. Kim, S. Maher, A. Bothwell, and D. Margulies. 1994. T cell receptor-MHC class I peptide interactions: Affinity, Kinetics and Specificity. *Science* 265:946:949.
 37. Matsui, K., J.J. Boniface, P. Steffner, P.A. Reay, and M.M. Davis. 1994. Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, no. 26:12862-6.
 38. Dal Proto, H., T.E. Johansen, B. Catipovic, D.J. Parfiit, D. Tuvenson, U. Gehter, S. Kozlowski, D.T. Fearon, and J.P. Schneck. 1993. A soluble divalent class I major histocompatibility complex molecule inhibits

- alloreactive T cells at nanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, no. 14:6671:5.
39. Mottez, E., P. Langlade-Demoyen, H. Gournier, F. Martinon, J. Maryanski, P. Kourilsky, and J.-P. Abastada. 1994. Cells expressing an MHC class I molecule with a single covalently bound peptide are high immunogenic. *J. Exp. Med.* in press.
 40. Wang, Q., C. Redovan, R. Tubbs, T. Olencki, E. Klein, S. Kudoh, J. Finke, and R.M. Bukowski. 1995. Selective cytokine gene expression in renal cell carcinoma tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes. *Int J Cancer* 61, no. 6:780:5.
 41. Roth, C., C. Rochlitz, and P. Kourilsky. 1994. Immune response against tumors. *Adv. in Immunol.* 57:281-351.
 42. Schonrich, G., U. Kalinke, F. Momburg, M. Malissen, A.M. Schmitt-Verhulst, B. Malissen, G.J. Hammerling, and B. Arnold. 1991. Down-regulation of T cell receptors on self reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* 65, no. 2:293:304.
 43. Zhang, L., W. Fung-Leung, and R. Miller. 1995. Down-regulation of CD8 on mature antigen-reactive T cells as a mechanism of peripheral tolerance. *J. Immunol.* 155:3464:3471.
 44. Bhandoola, A., E.A. Cho, K. Yui, H.U. Saragovi, M.I. Greene, and H. Quill. 1993. Reduced CD3-mediated protein tyrosine phosphorylation in anergic CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol.* 151, no. 5:2355-67.
 45. Evans, R., S.J. Kamdar, T.M. Duffy, D.M. Krupke, J.A. Fuller, and M.E. Dudley. 1995. The therapeutic efficacy of murine anti-tumor T cells: freshly isolated T cells are more therapeutic than T cells expanded in vitro. *Anticancer Res* 15, no. 2:441-7.
 46. Radvanyi, L.G., G.B. Mills and R.G. Miller. 1993. Religation of the T cell receptor after primary activation of mature T cells inhibits proliferation and induces apoptotic cell death. *J. Immunol.* 150, no. 12:5704:15.
 47. Lone, Y.-C., D. Ojcius, M. Belio, P. Kourilsky, and J.-P Abastado. 1994. Major contribution of the β chain to the antigen specificity of a T cell receptor. *C.R. Acad. Sci. Paris* 317:645-51.
 48. Gelber, C., L. Eisenbach, M. Feldman, and R.S. Goodenow. 1992. T-cell subset analysis of Lewis lung carcinoma tumor rejection: heterogeneity of effectors and evidence for negative regulatory lymphocytes correlating with metastasis. *Cancer res.* 52, no. 23: 6507-15.
 49. Dye, E.S., and R.J. North. 1981. T cell-mediated immunosuppression as an obstacle to adoptive immunotherapy of the P815 mastocytoma and its metastases. *J. Exp. Med.* 154, no. 4: 1033-42.
 50. Wang, R., and M. Taniguchi. 1995. Limited T cell antigen receptor repertoire in tumor-infiltrating lymphocyte and inhibition of experimental lung metastasis of murine melanoma by anti-TCR antibody. *J. Immunol.* 154, no. 4:1797-803.
 51. Green, D.R., and D.R. Webb. 1993. Saying the 'S' word in public. *Immunol Today* 14, no. 11:523-5.

52. Qin, S., S.P. Cobbold, H. Pope, J. Elliott, D. Kioussis, J. Davies, and H. Waldmann. 1993. "Infectious" transplantation tolerance. *Science* 259, no. 5097:974-7.
53. Saoudi, A., S. Simmonds, I. Huitinga, and D. Mason. 1995. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in rats by targeting autoantigen to B cells: evidence that the protective mechanism depends on changes in the cytokine response and migratory properties of the autoantigen-specific T cells. *J. Exp. Med.* 182, no. 2:335-44.
54. Lombardi, G., A.N. Warrens, and R.I. Lechler. 1995. Anergic T cells act as suppressor cells in vitro. *Transplant Proc.* 27, no. 1:235-6.
55. Boon, et al. 1994. Tumor Antigens Recognized By T Lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 12:337-365.
56. Leach, et al. 1996. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science* 271:1734-1736.
57. Boon, et al. 1996. Human Tumor Antigens Recognized by T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183:725-729.
58. Engelhard, V.H. 1994. Structure of Peptides Associated with MHC class I Molecules. *Curr. Opin. in Immunology* 6:13-23.
59. Traversari et al. 1992, *J. Exp. Med.* 176, 1453-1457
60. Gaugler et al. 1994, *J. Exp. Med.* 179, 921-930
61. Wolfel et al. 1994, *Eur. J. immunol.* 27, 759-764
62. Wolfel et al. 1994, *Eur. J. immunol.* 27, 759-764
63. Kawakami et al. 1994, *J. Exp. Med.* 180, 347-352
64. Coulie et al. 1994, *J. Exp. Med.* 180, 35-42
65. Kawakami et al. 1994, *PNAS*, 91, 3515-3519
66. Kawakami et al. 1994, *PNAS*, 91, 6458-6462
67. Cox et al. 1994, *Science* 264, 716-719
68. Coligan et al., "Current Protocols in Immunology," vol. 1, p. 3.11.1 et seq., Wiley Intersciences Eds.
69. Rosenberg, S.A. 1991. Immunotherapy and gene therapy of cancer. *Cancer Res* 51, no. 18 Suppl:5074s-5079s.
70. Melief, C.J. 1992. Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes. *Adv Cancer Res* 58:143-75.
71. Rammensee, H.G., K. Falk, and O. Rotzschke. 1993. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 11:213-44.
72. Germain, R.N. 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76, no. 2:287-99.
73. Madden, D.R., J.C. Gorga, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1991. The structure of HLA-B27 reveals monomer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature (London)* 353:321-325.
74. Matsumura, M., D.H. Fremont, P.A. Peterson, and I.A. Wilson. 1992. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 257:927-934.
75. Sette, A., A. Vitiello, B. Rehman, P. Fowler, R. Nayersina, W.M. Kast, C.J. Melief, C. Oseroff, L. Yuan, J. Ruppert, and et al. 1994. The relationship

- between class binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol* 153, no. 12:5586-92.
76. Mottez, E., C. Jaulin, F. Godeau, J. Choppin, J.-P. Levy, and P. Kourilsky. 1991. A single-chain murine class I major transplantation antigen. *Eur. J. Immunol.* 21:467-471.
77. Abastado, J.P., Y.C. Lone, A. Casrouge, G. Boulot, and P. Kourilsky. 1995. Dimerization of soluble MHC-peptide complexes is sufficient for activation of T-cell hybridoma and induction of unresponsiveness. *J. Exp. Med.* in press.
78. Abastado, J.-P., D. Ojcius, A. Casrouge, P. Yeh, T. Schumacher, H. Ploegh, and P. Kourilsky. 1993. A soluble, single-chain Kd molecule produced by yeast selects a peptide repertoire indistinguishable from that of cell-surface-associated K^d. *Eur. J. Immunol.* 23:1776-1783.
79. Godeau, F., I. Luescher, D. Ojcius, C. Saucier, E. Mottez, L. Cabanie', and P. Kourilsky. 1992. Purification and ligand binding of a soluble class I MHC molecule consisting of the first three domains of H-2K^d fused to I32-microglobulin expressed in the baculo/insect cell system. *J. Biol. Chem.* 267:24223-24229.
80. Ojcius, D., F. Godeau, J.-P. Abastado, J.-L. Casanova, and P. Kourilsky. 1993. Real-time measurement of antigenic peptide binding to empty and preloaded single-chain MHC class I molecules. *Eur. J. Immunol.* 23:1118-1124.
81. Ruppert, J., J. Sidney, E. Celis, R. Kubo, H. Grey, and A. Sette. 1993. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell* 74:929-937.
82. Guilloux, Y., and S. Lucas.
83. Celis, E., V. Tsai, C. Crimi, R. De Mars, P.A. Wentworth, R.W. Chesnut, H.M. Grey, A. Sette, and H.M. Serra. 1994. Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, no. 6:2105-9.
84. Mottez, E., P. Langlade-Demoyen, H. Gournier, F. Martinon, J. Maryanski, P. Kourilsky, and J.-P. Abastado. 1994. Cells expressing an MHC class I molecule with a single covalently bound peptide are highly immunogenic. *J. Exp. Med.* in press.
85. Langlade-Demoyen, P., J.-P. Levraud, P. Kourilsky, and J.-P. Abastado. 1994. Primary CTL induction using peptide stripped autologous cells. *Int. Immunol.* 6:1759-1766.
86. Gagliardi, M., G. De Petrillo, S. Salemi, L. Boffa, M. Longobardi, P. Dellabona, G. Casorati, N. Tanigaki, R. Harris, A. Lanzavecchia, and V. Barnada. 1995. Presentation of peptides by cultured monocytes or activated T cells allows specific priming of human cytotoxic T lymphocytes in vitro. *Int. Immunol.* 7:1741-52.
87. Morrison, J., J. Elvin, F. Latron, F. Gotch, R. Moots, J.L. Strominger, and A. McMichael. 1992. Identification of the nonamer peptide from influenza A matrix protein and the role of pockets of HLA-A2 in its recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 22, no. 4:903-7.

88. Bednarek, M.A., S.Y. Sauma, M.C. Gammon, G. Porter, S. Tamhankar, A.R. Williamson, and H.J. Zweerink. 1991. The Minimum Peptide Epitope from the Influenza Virus Matrix Protein - Extra and Intracellular Loading of HLA-A2. *J Immunol* 147, no. 12:4047-4053.
89. Moss, P.A., R.J. Moots, W.M. Rosenberg, S.J. Rowland-Jones, H.C. Bodmer, A.J. McMichael, and J.I. Bell. 1991. Extensive conservation of alpha and beta chains of the human T-cell antigen receptor recognizing HLA-A2 and influenza A matrix peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, no. 20:8987-90.
90. Lehner, P.J., E.C. Wang, P.A. Moss, S. Williams, K. Platt, S.M. Friedman, J.I. Bell, and L.K. Borysiewicz. 1995. Human HLA-A0201-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of influenza A is dominated by T cells bearing the V beta 17 gene segment. *J Exp Med* 181, no. 1:79-91.
91. Pannetier, C., M. Cochet, S. Darche, A. Casrouge, M. Zoller, and P. Kourilsky. 1993. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, no. 9:4319-23.
92. Even, J., A. Lim, I. Puisieux, L. Ferradini, P.Y. Dietrich, A. Toubert, T. Hercend, F. Triebel, C. Pannetier, and P. Kourilsky. 1995. T-cell repertoires in healthy and diseased human tissues analyzed by T-cell receptor beta-chain CDR3 size determination: evidence for oligoclonal expansions in tumours and inflammatory diseases. *Res Immunol* 146, no. 2:65-80.
93. Bodmer, H.C., J.M. Bastin, B.A. Askonas, and A.R. Townsend. 1989. Influenza-specific cytotoxic T-cell recognition is inhibited by peptides unrelated in both sequence and MHC restriction. *Immunology* 66, no. 2:163-9.
94. Maryanski, J.L., J.P. Abastado, G. Corradin, and J.C. Cerottini. 1989. Structural features of peptides recognized by H-2Kd-restricted T cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54:545-50.
95. Chen, B.P., J. Rothbard, and P. Parham. 1990. Apparent lack of MHC restriction in binding of class I HLA molecules to solid-phase peptides. *J Exp Med* 172, no. 3:931-6.
96. Choppin, J., F. Martinon, E. Gomard, E. Bahraoui, F. Connan, M. Bouillot, and J.P. Levy. 1990. Analysis of physical interactions between peptides and HLA molecules and application to the detection of human immunodeficiency virus 1 antigenic peptides. *J Exp Med* 172, no. 3:889-99.
97. Frelinger, J.A., F.M. Gotch, H. Zweerink, E. Wain, and A.J. McMichael. 1990. Evidence of widespread binding of HLA class I molecules to peptides. *J Exp Med* 172, no. 3:827-34.
98. Townsend, A., C. Ohlen, J. Bastin, H.-G. Ljunggren, L. Foster, and K. Karre. 1989. Association of class I MHC heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 340:443-448.
99. Carreno, B.M., R.W. Anderson, J.E. Coligan, and W.E. Biddison. 1990. HLA-B37 and HLA-A2.1 molecules bind largely nonoverlapping sets of peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, no. 9:3420-4.
100. Benjamin, R.J., J.A. Madrigal, and P. Parham. 1991. Peptide binding to empty HLA-B27 molecules of viable human cells. *Nature* 351, no. 6321:74-7.

101. Luescher, I.F., P. Romero, J.C. Cerottini, and J.L. Maryanski. 1991. Specific binding of antigenic peptides to cell-associated MHC class I molecules. *Nature* 351, no. 6321:72-4.
102. Cerundolo, V., J. Alexander, K. Anderson, C. Lamb, P. Cresswell, A. McMichael, F. Gotch, and A. Townsend. 1990. Presentation of viral antigen controlled by a gene in the major histocompatibility complex. *Nature* 345, no. 6274:449-52.
103. Hosken, N.A., and M.J. Bevan. 1990. Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class I molecules. *Science* 248, no. 4953:367-70.
104. Schumacher, T.N.M., M.-T. Heemels, J.J. Neefjes, W.M. Kast, C.J.M. Melief, and H.L. Ploegh. 1990. Direct binding of peptide to empty MHC class I molecules in intact cells and *in vitro*. *Cell* 62:563-567.
105. Townsend, A., T. Elliott, V. Cerundolo, L. Foster, B. Barber, and A. Tse. 1990. Assembly of MHC class I molecules analyzed *in vitro*. *Cell* 62:285-295.
106. Parker, K.C., B.M. Carreno, L. Sestak, U. Utz, W.E. Biddison, and J.E. Coligan. 1992. Peptide binding to HLA-A2 and HLA-B27 isolated from *Escherichia coli*. Reconstitution of HLA-A2 and HLA-B27 heavy chain/beta 2-microglobulin complexes requires specific peptides. *J Biol Chem* 267, no. 8:5451-9.
107. Carbone, F.R., M.W. Moore, J.M. Sheil, and M.J. Bevan. 1988. Induction of cytotoxic T lymphocytes by primary *in vitro* stimulation with peptides. *J Exp Med* 167, no. 6:1767-79.
108. Macatonia, S.E., P.M. Taylor, S.C. Knight, and B.A. Askonas. 1989. Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses *in vitro*. *J Exp Med* 169, no. 4:1255-64.
109. De Bruijn, M., J.D. Nieland, T.N. Schumacher, H.L. Ploegh, W.M. Kast, and C.J. Melief. 1992. Mechanisms of induction of primary virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *Eur J Immunol* 22, no. 11:3013-20.
110. De Bruijn, M.L., T.N. Schumacher, J.D. Nieland, H.L. Ploegh, W.M. Kast, and C.J. Melief. 1991. Peptide loading of empty major histocompatibility complex molecules on RMA-S cells allows the induction of primary cytotoxic T lymphocyte responses. *Eur J Immunol* 21, no. 12:2963-70.
111. Wentworth, P.A., E. Celis, C. Crimi, S. Stitely, L. Hale, V. Tsai, H.M. Serra, M.F. Del Guercio, B. Livingston, D. Alazard, and et al. 1995. *In vitro* induction of primary, antigen-specific CTL from human peripheral blood mononuclear cells stimulated with synthetic peptides. *Mol Immunol* 32, no. 9:603-12.
112. Salter, R.D., and P. Cresswell. 1986. Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid. *Embo J* 5, no. 5:943-9.
113. Linsley, P.S., W. Brady, M. Urnes, L.S. Grosmaire, N.K. Damle, and J.A. Ledbetter. 1991. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 174, no. 3:561-9.
114. Linsley, P.S., W. Brady, L. Grosmaire, A. Aruffo, N.K. Damle, and J.A. Ledbetter. 1991. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28

- costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* 173, no. 3:721-30.
115. Freeman, G.J., J.G. Gribben, V.A. Boussiotis, J.W. Ng, V.A. Restivo, Jr., L.A. Lombard, G.S. Gray, and L.M. Nadler. 1993. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counterreceptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 262, no. 5135:909-11.
 116. Janeway, C.A., Jr., and K. Bottomly. 1994. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 76, no. 2:275-85.
 117. Dal Porto, J., T.E. Johansen, B. Catipovic, D.J. Parfiit, D. Tuveson, U. Gether, S. Kozlowski, D.T. Fearon, and J.P. Schneck. 1993. A soluble divalent class I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive T cells at nanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, no. 14:6671-5.
 118. Kos, F.J., and E.G. Engleman. 1995. Requirement for natural killer cells in the induction of cytotoxic T cells. *J Immunol* 155, no. 2:578-84.
 119. Kos, F.J., and E.G. Engleman. 1996. Immune regulation: a critical link between NK cells and CTLs. *Immunol today* 17:174-176.
 120. Roth, C., P. Kourilsky, and D.M. Ojcius. 1994. Ly-49-independent inhibition of natural killer cell-mediated cytotoxicity by a soluble major histocompatibility complex class I molecule. *Eur J Immunol* 24, no. 9:2110-4.
 121. Ljunggren, H.G., and K. Karre. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11, no. 7:237-44.
 122. Yu, Y.Y.L., George, T., Dorfman, J.R., Roland, J., Kumar, V., and Bennett, M. 1996. The role of Ly49A and 5E6(Ly49C) molecules in hybrid resistance mediated by murine natural killer cells against normal T cell blasts. *Immunity* 4:67-76.
 123. Vicar, A.P., and Zlotnik, A. 1996. Mouse NK1.1+ t cells: a new family of T cells. *Immunol today* 17:71-76.
 124. Hoffmann, M.W., J. Allison, and J.F.A.P. Miller. 1992. Tolerance Induction by Thymic Medullary Epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, no. 7:2526-2530.
 125. Hoffmann, M.W., W.R. Heath, D. Ruschmeyer, and J.F. Miller. 1995. Deletion of high-avidity T cells by thymic epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, no. 21:9851-5.
 126. Sprent, J., D. Lo, E.K. Gao, and Y. Ron. 1988. T cell selection in the thymus. *Immunol Rev* 101:173-90.
 127. Kourilsky, P. 1995. Thoughtful cruises in oceans of peptides and T cells. *Res. Immunol* 146:309-320.
 128. Ashton-Rickardt, P.G., A. Bandeira, J.R. Delaney, L. Van Kaer, H.P. Pircher, R.M. Zinkernagel, and S. Tonegawa. 1994. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* 76, no. 4:651-63.
 129. Ashton-Rickardt, P.G., and S. Tonegawa. 1994. A differential-avidity model for T-cell selection. *Immunol Today* 15, no. 8:362-6.
 130. Rötzschke, O., Falk, K., Deres, K., Schild, H., Norda, M., Metzger, J., Jung, G., and Rammensee, H.-G. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature (London)* 1990;348:252-254.

131. Bednarek, M.A., Sauma, S.Y., Gammon, M.C., Porter, G., Tamhankar, S., Williamson, A.R., and Zweerink, H.J. The Minimum Peptide Epitope from the Influenza Virus Matrix Protein - Extra and Intracellular Loading of HLA-A2. *J. Immunol* 1991;147:4047-4053.

132. Morrison, J., Elvin, J., Latron, F., Gotch, F., Moots, R., Strominger, J.L., and McMichael, A. Identification of the nonamer peptide from influenza A matrix protein and the role of pockets of HLA-A2 in its recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol* 1992;22:903-7.

133. Coulie, P.G., Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen, E., Lurquin, C., Szikora, J.P., and et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas (see comments). *J. Exp. Med.* 1994;180:35-42.

134. Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C.H., Robbins, P.F., Sakaguchi, K., Appella, E., Yannelli, J.R., Adema, G.J., Miki, T., and Rosenberg, S.A. Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91:6458-62.

135. Morgan, D.J., Liblau, R., Scott, B., Fleck, S., Mc Devitt, H.O., Sarvetnick, N., Lo, D. and Sherman, L.A. (1996) *J. Immunol.* 157, 978-83.

136. Cabaniols, J.P., Cibotti, R., Kourilsky, P., Kosmatopoulos, K. and Kanellopoulos, J.M. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24, 1743-9.

137. Romero, P., Corradin, G., Luescher, I.F. and Maryanski, J.L. (1991) *J. Exp. Med.* 174, 603-12.

138. Kuwano, K., Braciale, T.J. and Ennis, F.A. (1988) *FASEB J.* 2, 2221.

139. Kane, K.P. and Mescher, M.F. (1993) *J. Immunol* 150, 4788-4797.

140. Rammensee, H.G., T. Friede, and S. Stevanović. 1995. MHC ligands and peptide motifs : first listing. *Immunogenetics* 41:178-228.

141. Maryanski, J.L., Romero, P., Van, P.A., Boon, T., Salemme, F.R., Cerottini, J.C. & Corradin, G. (1991). The identification of tyrosine as a common key residue in unrelated H-2K^d restricted antigenic peptides. *Int. Immunol* 3:1035-42.

142. Kahn-Perles, B., C. Barra, J.Jehan, D. Fourel, M. Barad, J.L. Maryanski, and F.A. Lemonnier. 1989, Cytotoxic T lymphocyte recognition of secreted HLA class I molecules. *J. Immunol.* 142:3021-5.

143. Espevik, T., and J. Nissen-Meyer. 1986. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J. Immunol. Meth.* 95:99-105.
- 5 144. Minoprio, P., A. Coutinho, S. Spinella, and M. Hontebeyrie-Joskowicz. 1991. Xid immunodeficiency imparts increased parasite clearance and resistance to pathology in experimental Chagas' disease. *Int. Immunol.* 3:427-33.
- 10 145. Gimmi, C.D., G.J. Freeman, J.G. Gribben, K. Sugita, A.S. Freedman, C. Morimoto, and L.M. Nadler. 1991. B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6575-9.
- 15 Abastado, J.-P., Jaulin, C., Schutze, M.-P., Langlade-Demoyen, P., Plata, F., Ozato, K. & Kourilsky, P. (1987). Fine mapping of epitopes by intradomain K^d/D^d recombinants. *J. Exp. Med.* 166:327-340.
- 20 Abastado, J.-P., Ojcius, D., Yeh, P., Schumacher, T., Ploegh, H. & Kourilsky, P. (1993). A soluble, single-chain K^d molecule produced by yeast selects a peptide repertoire indistinguishable from that of cell-surface-associated K^d. *Eur. J. Immunol.* 23:1776-1783.
- 25 Engel, L. Ottenhoff, T. & Klausner, R. (1992). High efficiency expression and solubilization of functional T cell antigen receptor heterodimers. *Science* 256:1318-1321.
- Harlow, E. & Lane, D. (1988). Antibodies, a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- 30 Kolanus, W., Romeo, C. & Seed, B. (1993). T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell.* 74:171-183.
- 35 Letourneur, F. & Malissen, B. (1989). Derivation of a T cell hybridoma variant deprived of functional T cell receptor and α chain transcripts reveals a nonfunctional mRNA of BW5147 origin. *Eur. J. Immunol.* 19:2269.
- Maryanski, J., Accolla, R. & Jordan, B. (1986). H-2 restricted recognition of cloned HLA class I gene products expressed in mouse cells. *J. Immunol.* 136:4340.
- 40 Matsui, K., Boniface, J.J., Reay, P.A., Schild, H., Fazekas, d.S.G.B. & Davis, M.M. (1991). Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science* 254:1788-91.
- Weber, S., Traunecker, A., Oliveri, F., Gerhard, W. & Karjalainen, K. (1992). Specific low-affinity recognition of MHC plus peptide by soluble T-cell receptor. *Nature* 356:793-795.

REVENDEICATIONS

1. Méthode de détection de la présence ou de
l'absence d'un lymphocyte antigène-spécifique, comprenant
5 les étapes consistant

à fournir un complexe comprenant un déterminant modifié
du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), en
association avec un antigène peptidique spécifique ;

à coupler ledit complexe à un support solide ;

10 à incuber le complexe couplé à un support solide avec un
échantillon biologique dans des conditions appropriées
pour lier un lymphocyte à un antigène ou à une molécule
du complexe majeur d'histocompatibilité ; et

15 à détecter la présence ou l'absence de lymphocytes liés
au complexe couplé à un support solide.

2. Méthode selon la revendication 1, caractérisé
en ce que le déterminant du CMH modifié est présent sous
la forme d'un dimère ou d'un polymère d'ordre supérieur,
ou d'un agrégat.

20 3. Méthode selon l'une des revendications 1 ou 2,
dans laquelle l'antigène est choisi dans le groupe
d'antigènes essentiellement formé par les antigènes
associés à des tumeurs, les antigènes dérivés d'un
parasite, les antigènes dérivés de bactéries et les
25 antigènes dérivés de virus tels que VIH, influenza, CMV,
VPH, Hépatite A, Hépatite B, Hépatite non-A non-B et
Hépatite C.

4. Méthode de détection de la présence ou de l'absence d'un lymphocyte T spécifique d'une tumeur, comprenant les étapes consistant
- 5 à fournir un complexe comprenant une molécule modifiée du complexe majeur d'histocompatibilité, en association avec un antigène spécifique de tumeur ;
- à coupler ledit complexe à un support solide ;
- à incuber ledit complexe couplé à un support solide avec un échantillon biologique ; et
- 10 à détecter la présence ou l'absence d'un lymphocyte T lié au complexe couplé à un support solide.
5. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1-4, caractérisée en ce que l'incubation comprend en outre une période d'environ 3 heures à environ 4°C, avec ou sans agitation douce, et en ce que
- 15 la détection comprend en outre l'utilisation d'un concentrateur de particules magnétiques.
6. Méthode d'obtention, d'isolement ou de purification d'un lymphocyte T antigène-spécifique,
- 20 comprenant les étapes consistant
- à fournir un complexe constitué essentiellement par un déterminant modifié du complexe majeur d'histocompatibilité en association avec un antigène peptidique ;
- 25 à coupler le complexe à un support solide ;
- à incuber ledit complexe couplé au support solide avec un échantillon biologique, de sorte que les lymphocytes T

puissent se lier au complexe couplé au support solide ;
et

à séparer des autres cellules les lymphocytes T liés.

5 7. Méthode de préparation d'un lymphocyte T
cytotoxique antigène-spécifique, comprenant les étapes
consistant

à fournir un complexe comprenant un déterminant modifié
du complexe majeur d'histocompatibilité en association
avec un antigène ;

10 à coupler le complexe à un support solide ; et

à mettre en contact le complexe couplé à un support
solide avec un lymphocyte primaire.

15 8. Méthode selon la revendication 6, caractérisée
en ce que l'antigène est choisi dans le groupe
d'antigènes essentiellement constitué par des antigènes
spécifiques de tumeur, des antigènes dérivés du VIH, des
antigènes dérivés du virus influenza et un antigène
dérivé de bactéries.

20 9. Méthode selon l'une quelconque des
revendications 6 ou 7, caractérisée en ce que l'antigène
est choisi dans le groupe d'antigènes essentiellement
constitué par des antigènes associés à des tumeurs, des
antigènes dérivés d'un parasite, des antigènes dérivés de
bactéries, et des antigènes dérivés de virus tels que
25 VIH, influenza, CMV, VPH, Hépatite A, Hépatite B,
Hépatite non-A non-B et Hépatite C.

10. Méthode destinée à tuer une cellule, contenant
un antigène spécifique de tumeur, comprenant l'étape
consistant à mettre en contact un lymphocyte T

cytotoxique tel qu'obtenu par la méthode selon la revendication 7 avec une cellule contenant un antigène spécifique de tumeur dans des conditions physiologiquement acceptables.

5 11. Méthode d'introduction d'un lymphocyte T cytotoxique dans un animal ou chez l'homme, comprenant l'étape consistant à fournir un lymphocyte T cytotoxique comme revendiqué à la revendication 7 et à injecter le lymphocyte T cytotoxique à l'homme ou à l'animal,
10 conjointement avec une solution, un véhicule ou des excipients physiologiquement acceptables.

 12. Méthode d'anergisation d'un lymphocyte T antigène-spécifique, comprenant l'étape consistant à mettre en contact le lymphocyte T avec une composition
15 comprenant un déterminant modifié du CMH, sous forme monomère en association avec un antigène peptidique.

 13. Méthode d'élimination d'une population de lymphocytes T antigène-spécifiques, comprenant les étapes consistant
20 à fournir un complexe comprenant un déterminant modifié du CMH, en association avec un antigène peptidique ;
à coupler ledit complexe à un support solide ; et
à introduire ledit complexe couplé à un support solide dans une population de lymphocytes T.

25 14. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1-9, 12 ou 13, caractérisée en ce que l'antigène peptidique est lié par covalence au déterminant modifié du CMH.

15. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1-9, 12 ou 13, caractérisée en ce que l'antigène peptidique est lié par covalence à un espaceur du déterminant modifié du CMH.

5 16. Méthode selon l'une quelconque des revendications 3-9, 12 ou 13, caractérisée en ce que le déterminant modifié du CMH est présent sous la forme d'un dimère ou d'un polymère d'ordre supérieur ou d'un agrégat.

10 17. Molécule recombinante du CMH, comprenant SC-A2 ou SC-Kd.

15 18. Molécule recombinante du CMH, biologiquement fonctionnelle, possédant l'activité de stimulation des lymphocytes T et de présentation d'antigène d'une molécule HLA-A2 naturelle, comprenant un ou plusieurs domaines de la chaîne lourde de HLA-A2 liés, par covalence ou autrement, à une b2-microglobuline, ou à un fragment de b2-microglobuline, par l'intermédiaire d'une région d'espaceur flexible.

20 19. Méthode de diagnostic pour déterminer la concentration ou la quantité relative de molécules solubles du CMH de classe I ou classe II dans un échantillon, comprenant les étapes consistant à utiliser une molécule recombinante, telle que revendiquée à la
25 revendication 18, en tant que référence standard, à mettre en contact l'échantillon avec des anticorps spécifiques du CMH ou de la microglobuline, ou des deux, et à déterminer la quantité de liaison dans l'échantillon, comparée à la liaison de la molécule
30 recombinante.

20. Kit de diagnostic servant à identifier des peptides antigéniques capables d'être présentés par une molécule A2 comprenant une molécule recombinante, telle que revendiquée à la revendication 18, et un peptide marqué, qui est capable de se lier à la molécule recombinante.

21. Molécule recombinante, selon la revendication 18, présente sous forme monomère ou sous forme dimère ou, de préférence, en tant que polymère ou agrégat de ces formes.

22. Méthode d'utilisation d'une molécule recombinante, telle que revendiquée à la revendication 21, destinée à stimuler et développer sélectivement un clone de CTL spécifique à partir d'une source de lymphocytes T, comprenant l'étape consistant à mettre en contact la molécule recombinante chargée d'un peptide spécifique avec un lymphocyte T.

23. Composition comprenant une molécule recombinante, selon l'une quelconque des revendications 18 ou 21, et un support solide.

24. Composition selon la revendication 23, caractérisée en ce que le support solide est une bille magnétique.

25. Méthode d'utilisation d'une composition, telle que revendiquée à la revendication 24, pour induire in vitro des CTL primaires peptide-spécifiques, comprenant l'étape consistant à incuber la composition selon la revendication 24 avec un peptide, suivie de l'étape consistant à mettre en contact la composition avec un PBL naif.

26. Méthode d'utilisation d'un CTL selon la revendication 25, pour lier un CTL à une cellule porteuse d'antigène, comprenant le fait de mettre en contact le CTL avec la cellule porteuse d'antigène.

5 27. Méthode de production d'anticorps spécifiques anti-HLA, comprenant l'étape consistant à introduire une molécule recombinante, selon l'une quelconque des revendications 18 ou 21, dans un animal et à isoler ou purifier des anticorps issus du sérum de l'animal.

10 28. Méthode de production d'une cellule productrice d'immunoglobuline par un animal, comprenant le fait d'introduire une molécule recombinante, selon l'une quelconque des revendications 18 ou 21, dans un animal et à isoler ou purifier la cellule.

15 29. Kit de diagnostic destiné à identifier la présence ou l'absence d'un anticorps spécifique anti-HLA dans un échantillon, comprenant une molécule recombinante, selon la revendication 18, et un moyen de détection pour détecter la liaison d'anticorps
20 spécifiques à la molécule recombinante.

30. Méthode de diagnostic destinée à identifier des peptides qui peuvent être présentés par une molécule A2 pour résulter en une réponse immunitaire dans un lymphocyte, comprenant le fait de mettre une molécule
25 recombinante, selon la revendication 18, en association avec un peptide, en contact avec un lymphocyte et à rechercher une réponse immunitaire.

30 31. Méthode selon la revendication 25, comprenant en outre l'addition d'une cellule stimulatrice, telle qu'un conA-blast activé par peptide.

32. Méthode d'utilisation d'une molécule recombinante telle que revendiquée dans les revendications 18 et 21, pour stimuler une réponse immune spécifique ex vivo ou pour une activation directe de lymphocytes in vivo par injection de la molécule sous forme de revêtement de support quelconque.

5

1/47

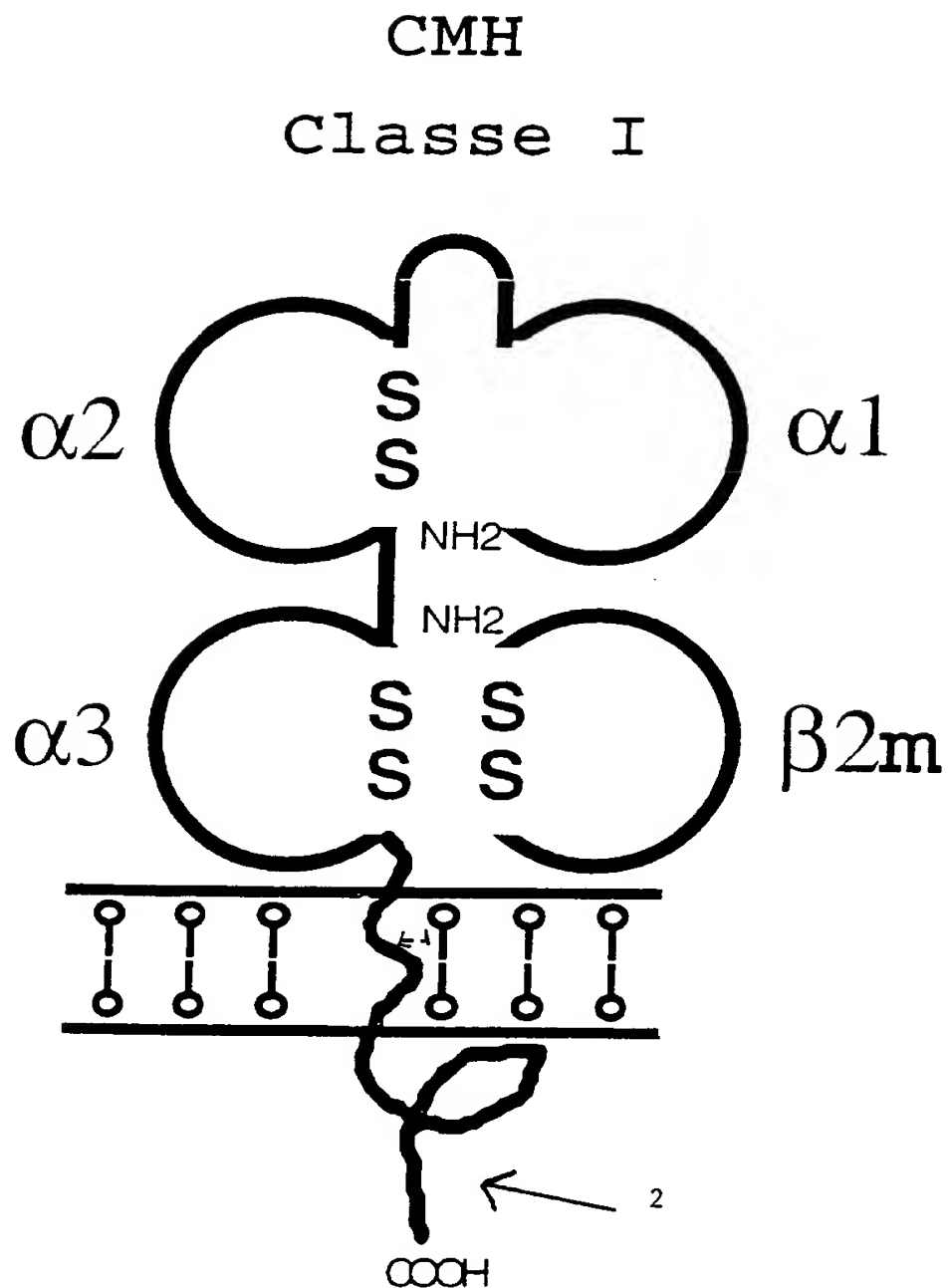


FIGURE 1

2/47

CMH
Classe II

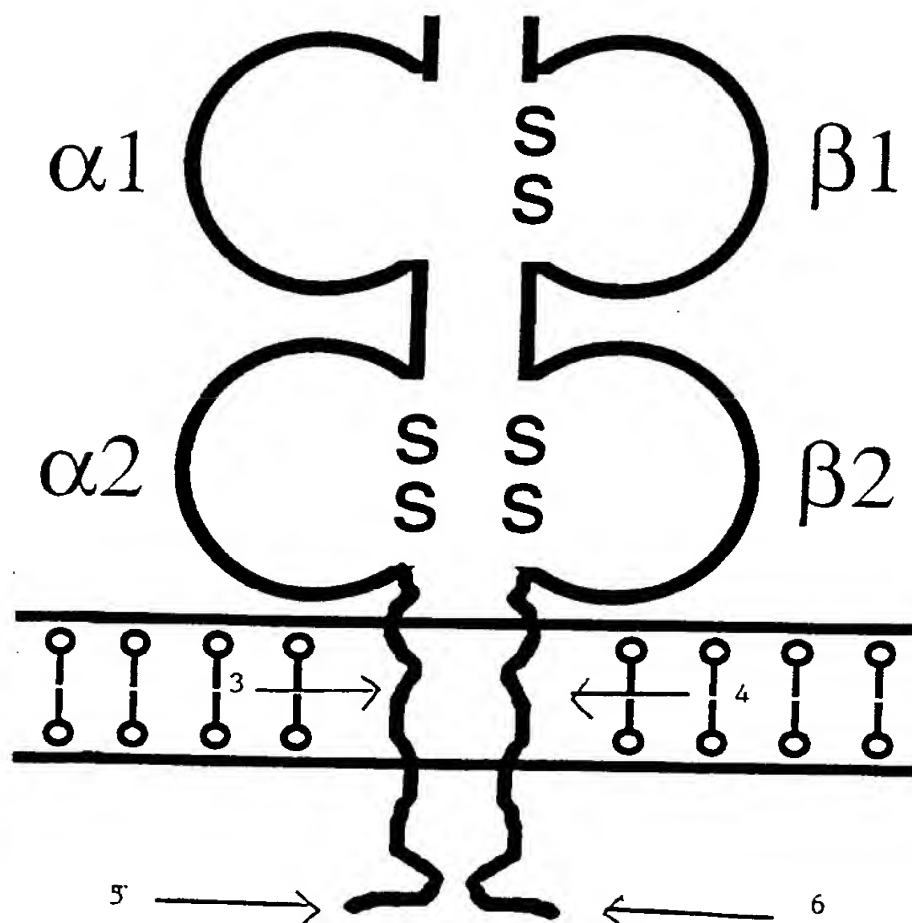


FIGURE 2

3/47

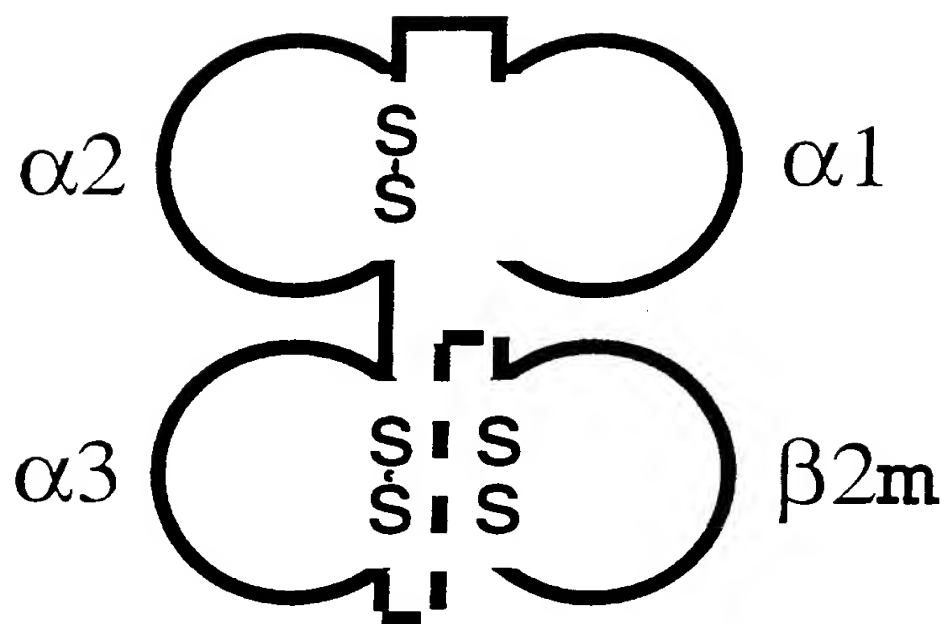


FIGURE 3A

4/47

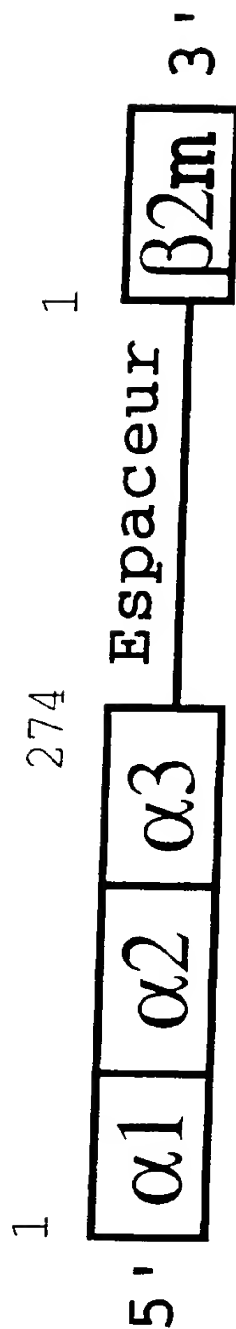


FIGURE 3 B

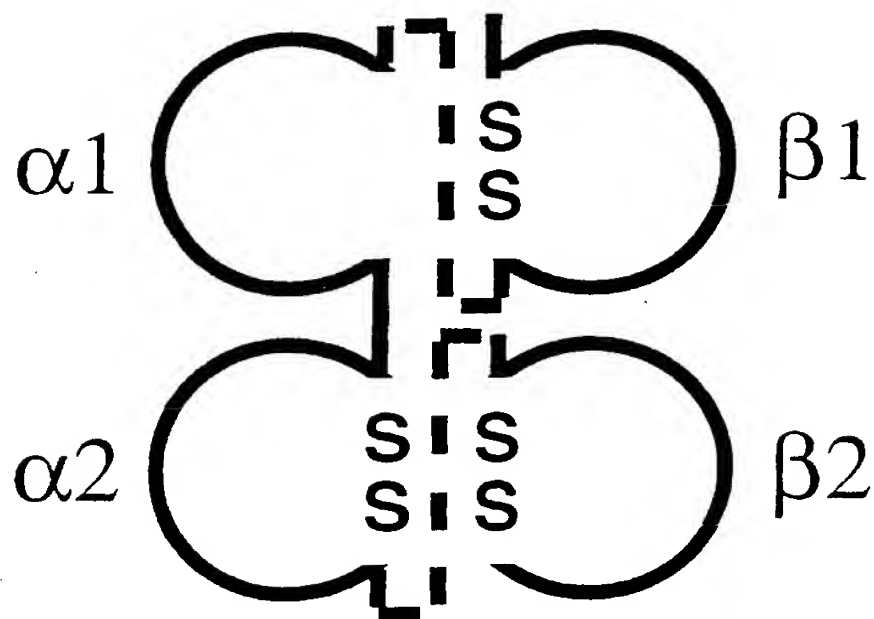


FIGURE 4A

6/47

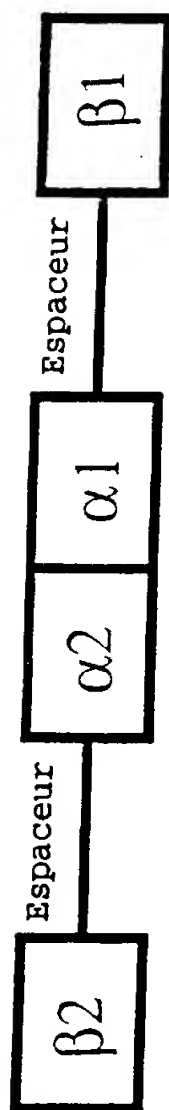


FIGURE 4B

7/47

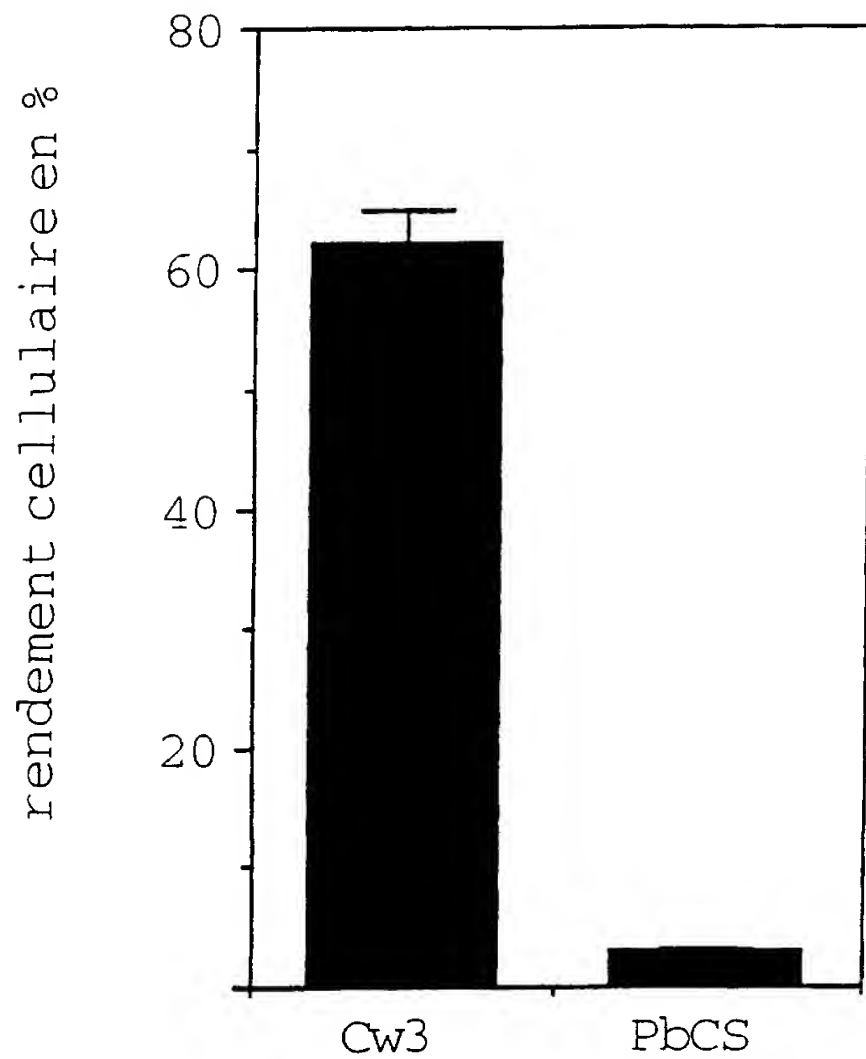


Figure 5

8/47

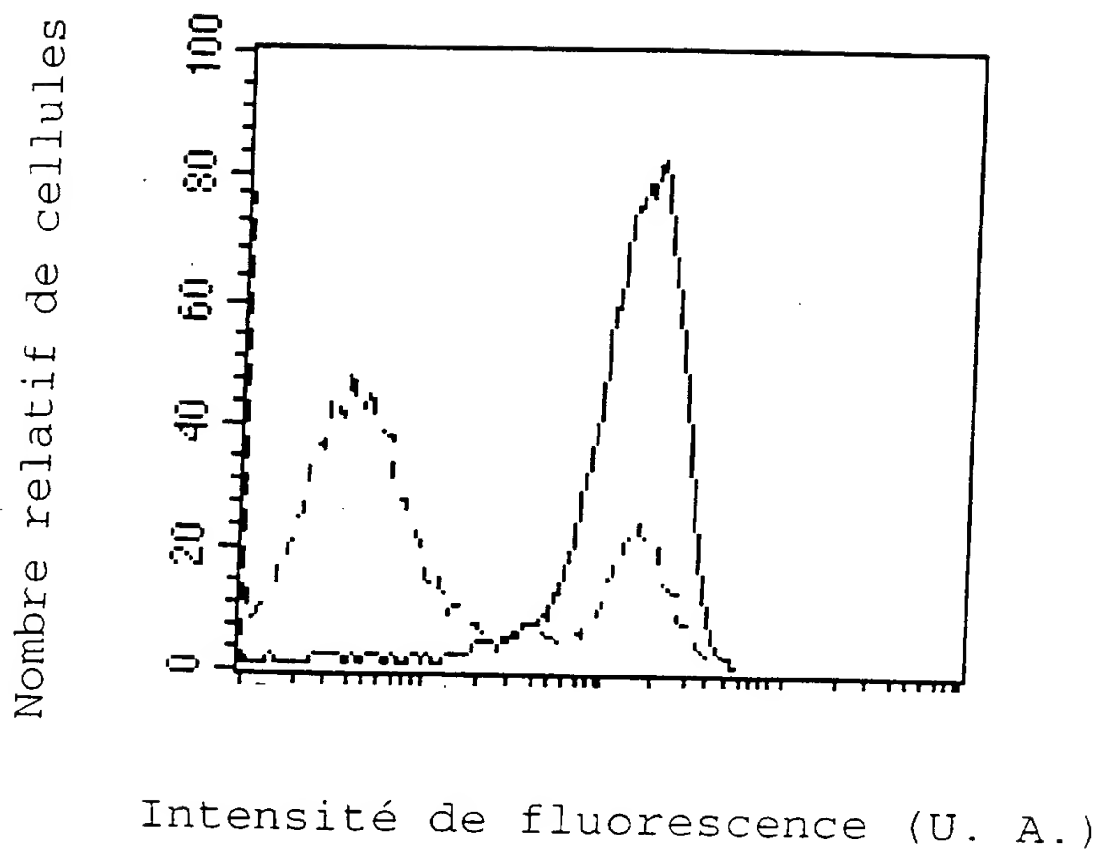


Figure 6

9/47

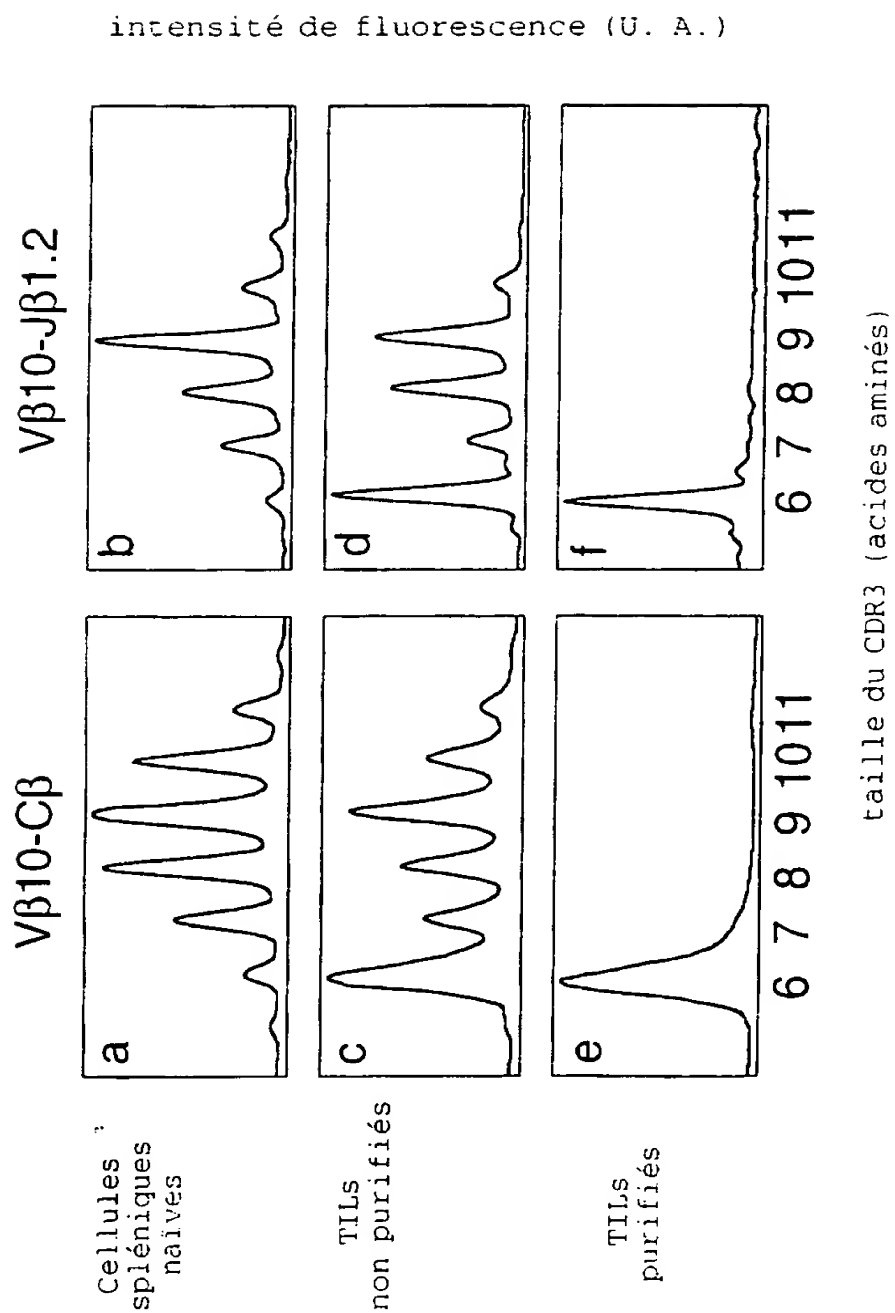


Figure 7a - f

10/47

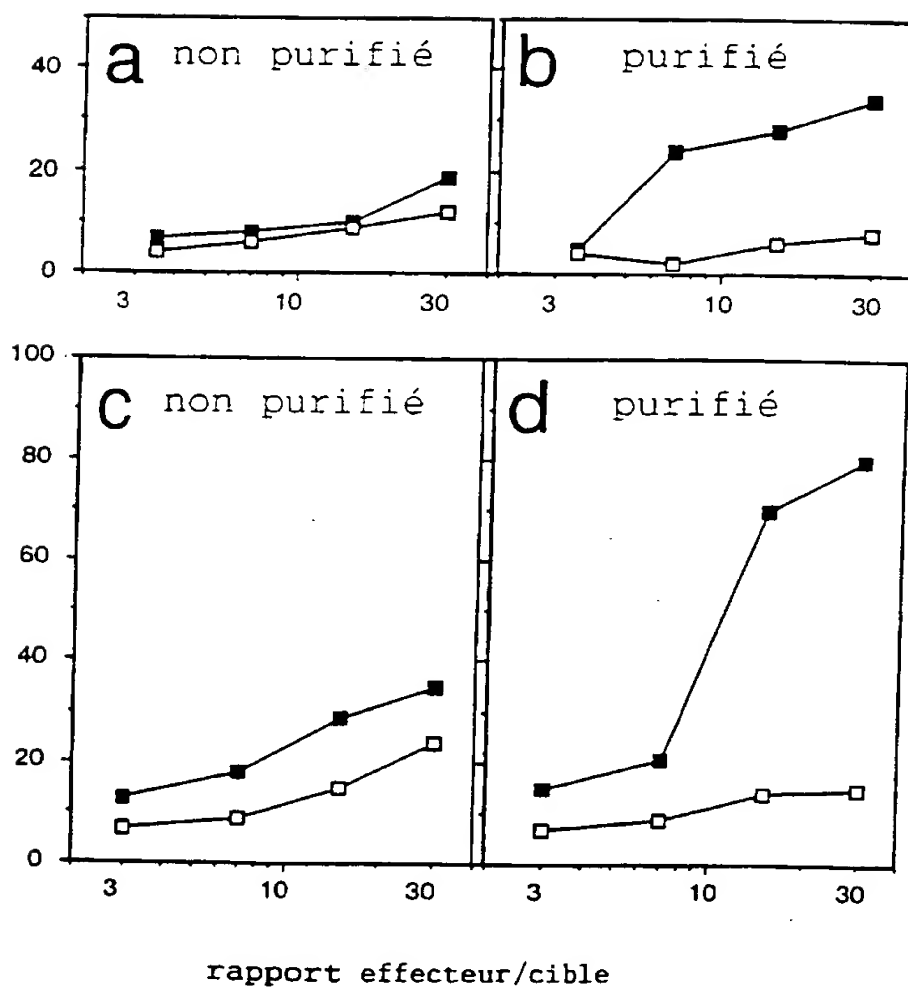
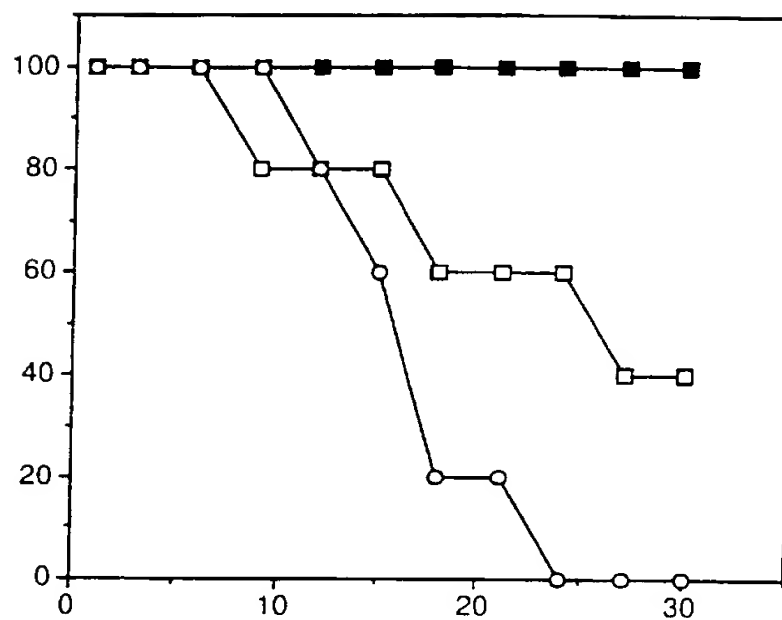


Figure 8a - d

11/47

pourcentage de survie des souris

a) Protection contre P815-Cw3



temps (jours)

—■— purifié

—□— non purifié

—○— non injecté

Figure 9A

12/47

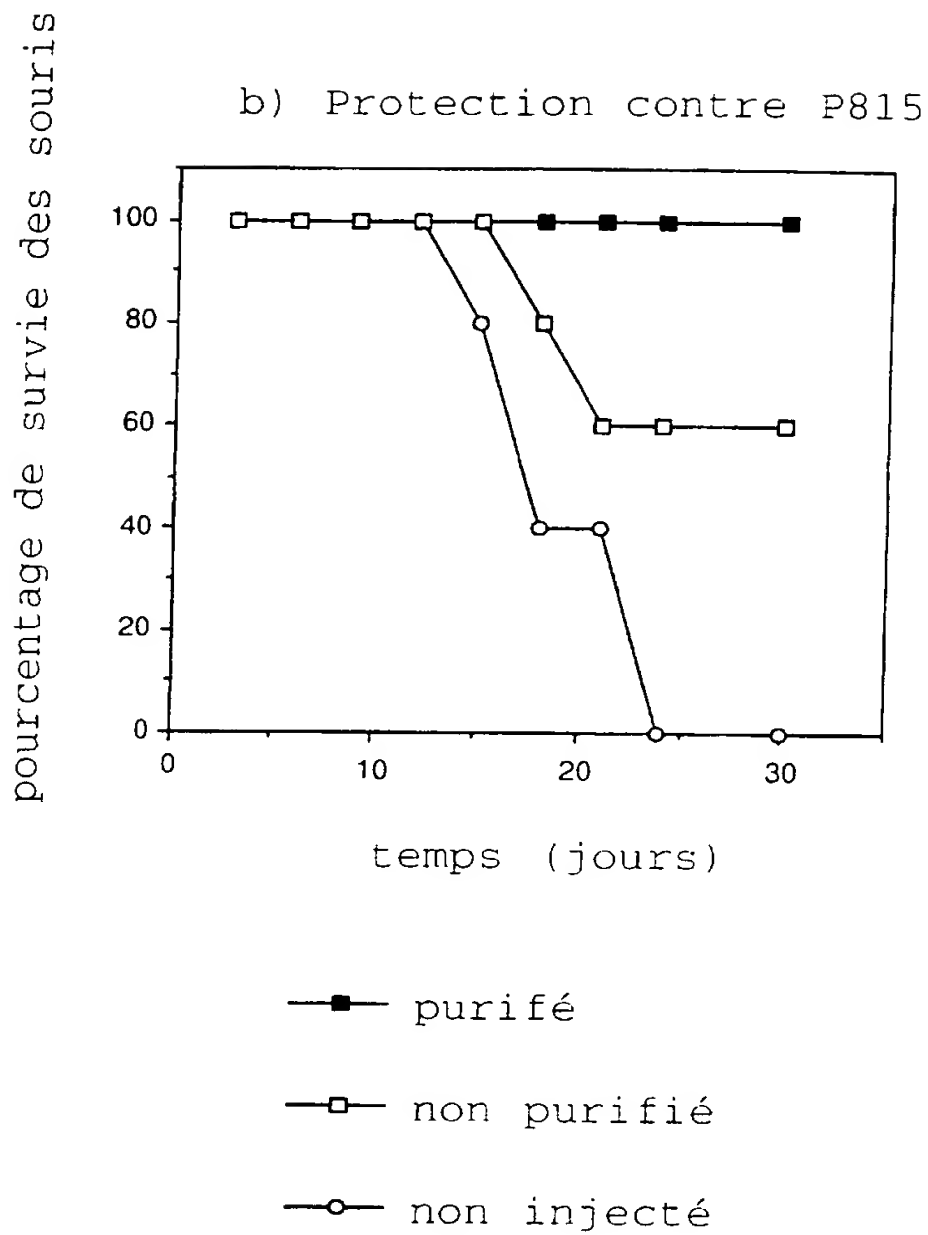


Figure 9B

13/47

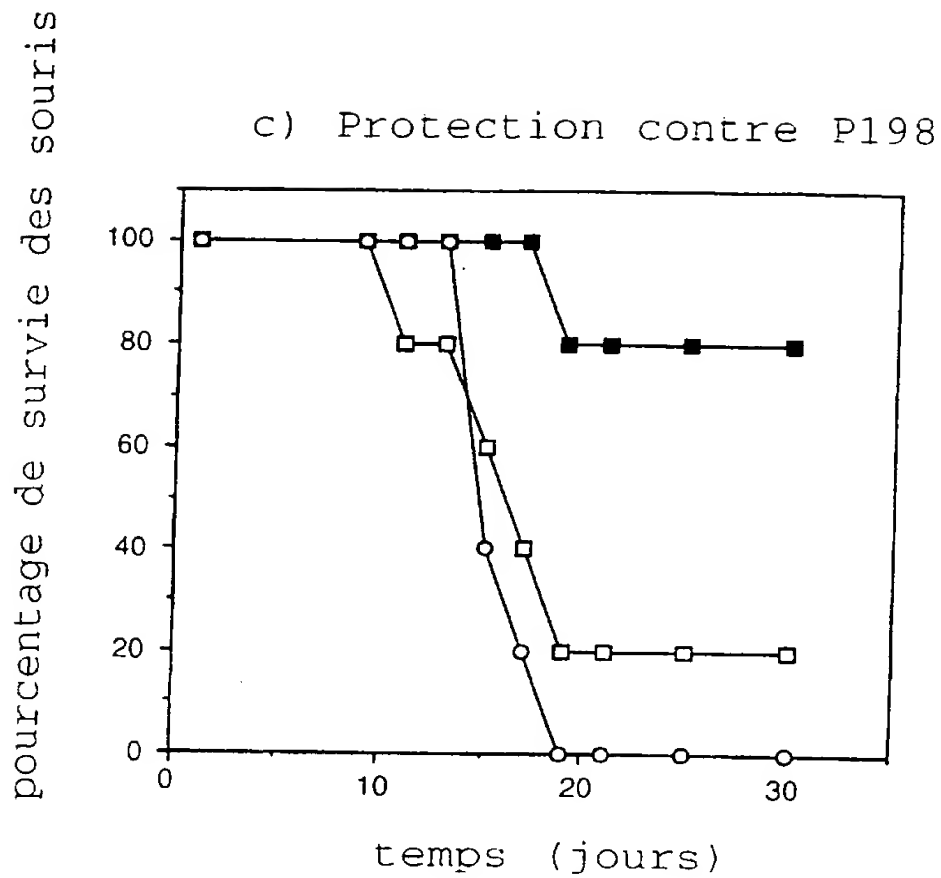


Figure 9C

14/47

Figure 10

49/1	ATG GCC	GTC	ATG	GCG	CCC	CGA	ACC	CTC	GTC	79/11	CTG	CTA	CTC	TCG	GGG	GCT	CTG	GCC	CTG	ACC
	Met	ala	val	met	ala	pro	arg	thr	leu	val	leu	leu	leu	ser	gly	ala	leu	ala	leu	thr
109/21	CAG ACC	TGG	GCG	GCG	TCT	CAC	TCC	ATG	AGG	139/31	TAT	TTC	TTC	ACA	TCC	GTG	TCC	CGG	CCC	GGC
	gln	thr	trp	ala	gly	ser	his	ser	met	arg	tyr	phe	phe	thr	ser	val	ser	arg	pro	gly
169/41	CGC GGG	GAG	CCC	GCG	TTC	ATC	GCA	GTG	GGC	199/51	TAC	GTG	GAC	GAC	ACG	CAG	TTC	GTG	CGG	TTC
	arg	gly	glu	pro	arg	phe	ile	ala	val	gly	tyr	val	asp	asp	thr	gln	phe	val	arg	phe
229/61	GAC AGC	GAC	GCC	GCG	AGC	CAG	AGG	ATG	GAG	259/71	CCG	CGG	GCG	CCG	TGG	ATA	GAG	CAG	GAG	GGT
	asp	ser	asp	ala	ser	gln	arg	met	glu	pro	arg	ala	ala	pro	trp	ile	glu	gln	glu	gly
289/81	CCG GAG	TAT	TGG	GAC	GGG	GAG	ACA	CGG	AAA	319/91	GTG	AAG	GCC	CAC	TCA	CAG	ACT	CAC	CGA	GTG
	pro	glu	tyr	trp	asp	gly	glu	thr	lys	val	lys	ala	ala	his	ser	gln	thr	his	arg	val
349/101	GAC CTG	GGG	ACC	CTG	GCG	GCC	TAC	TAC	AAC	379/111	CAG	AGC	GAG	GCC	GGT	TCT	CAC	ACC	GTC	CAG
	asp	leu	gly	thr	leu	arg	gly	tyr	asn	gln	ser	gln	glu	ala	gly	ser	his	thr	val	gln
409/121	AGG ATG	TAT	GGC	TGC	GAC	GTG	GGG	TCG	GAC	439/131	TGG	CGC	TTC	CTC	CGC	GGG	TAC	CAC	CAG	TAC
	arg	met	tyr	gly	cys	asp	val	gly	ser	asp	trp	arg	phe	leu	arg	gly	tyr	his	gln	tyr
469/141	GCC TAC	GAC	GGC	AAG	GAT	TAC	ATC	GCC	CTG	499/151	AAA	GAG	GAC	CTG	CGC	TCT	TGG	ACC	GCG	GCG
	ala	tyr	asp	gly	lys	asp	tyr	ile	ala	leu	lys	glu	asp	leu	arg	ser	trp	thr	ala	ala
529/161	GAC ATG	GCA	GCT	CAG	ACC	ACC	AAG	CAC	AAG	559/171	TGG	GAG	GCG	GCC	CAT	GTG	GCG	GAG	CAG	TTG
	asp	met	ala	ala	gln	thr	lys	his	lys	trp	glu	glu	ala	ala	his	val	ala	glu	gln	leu

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

15/47

Figure 10 (suite)

589/181 AGA GCC TAC CTG GAG GGC ACG TGC GTG GAG TGG CTC 619/191 CGC AGA TAC CTG GAG AAC GGG AAG
 arg ala tyr leu glu gly thr cys val glu trp leu arg arg tyr leu glu asn gly lys
 649/201 GAG ACG CTG CAG CGC ACG GAC GCC CCC AAA ACG CAT 679/211 ATG ACT CAC CAC GCT GTC TCT GAC
 glu thr leu gln arg thr asp ala pro lys thr his met thr his ala val ser asp
 709/221 CAT GAA GCC ACC CTG AGG TGC TGG GCC CTG AGC TTC TAC CCT GCG GAG ATC ACA CTG ACC
 his glu ala thr leu arg arg cys thr ala leu ser phe tyr pro ala glu ile thr leu thr
 769/241 TGG CAG CGG GAT GGG GAG GAC CAG ACC CAG GAC ACG GAG CTC GTG GAG ACC AGG CCT GCA
 trp gln arg asp glu gly gln thr gln asp thr glu leu val glu thr arg pro ala
 829/261 GGG GAT GGA ACC TTC CAG AAG TGG GCG GCT GTG GTG CCT TCT GGA CAG GAG CAG AGA
 gly asp gly thr phe thr phe gln lys trp ala ala val val pro ser gly gln glu gln arg
 889/281 TAC ACC TGC CAT GTG CAG CAT GAG GGT TTG CCC AAG CCC CTC ACC CTG AGA TGG GGT GGC
 tyr thr cys his val gln his glu gly leu pro lys pro leu thr leu arg trp gly gly
 949/301 GGT GGA TCA GGC GGT GGT GCG TCG GGT GGC GGC GGA TCC ATC CAG CGT ACT CCA AAG ATT
 gly gly ser gly gly gly gly ser gly gly gly gly gly ser ile gln arg thr pro lys ile
 1009/321 CAG GTT TAC TCA CGT CAT CCA GCA GAG AAT GGA AAG TCA AAT TTC CTG AAT TGC TAT GTG
 gln val tyr ser arg his pro ala glu asn gly lys ser asn phe leu asn cys tyr val
 1069/341 TCT GGG TTT CAT CCA TCC GAC ATT GAA GTT GAC TTA CTG AAG AAT GGA GAG AGA ATT GAA
 ser gly phe his pro ser asp ile glu val asp leu leu lys asn gly glu arg ile glu
 1129/361 AAA GTG GAG CAT TCA GAC TTG TCT TTC AGC AAG GAC TGG TCT TTC TAT CTC TTG TAC TAC
 lys val glu his ser asp leu ser phe ser lys asp trp ser phe tyr leu leu tyr tyr
 1189/381 ACT GAA TTC ACC CCC ACT GAA AAA GAT GAG TAT GCC TGC CGT GTG AAC CAT GTG ACT TTG
 thr glu phe thr pro thr glu lys asp glu tyr ala cys arg val asn his val thr leu
 1249/401 TCA CAG CCC AAG ATA GTT AAG TGG GAT CGA GAC ATG TAA GCA GCA TCA TGG AGG TTG AAG
 ser gln pro lys ile val lys trp asp arg asp met OCH ala ala ser trp arg leu lys

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

16/47

Figure 11A



17/47

Figure 11B

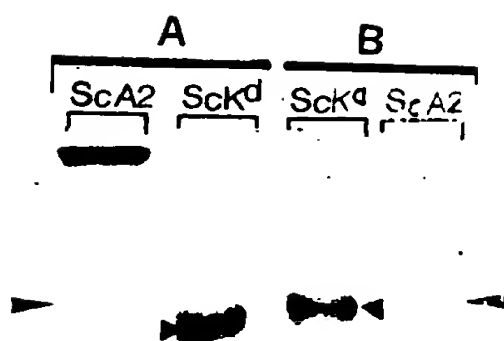
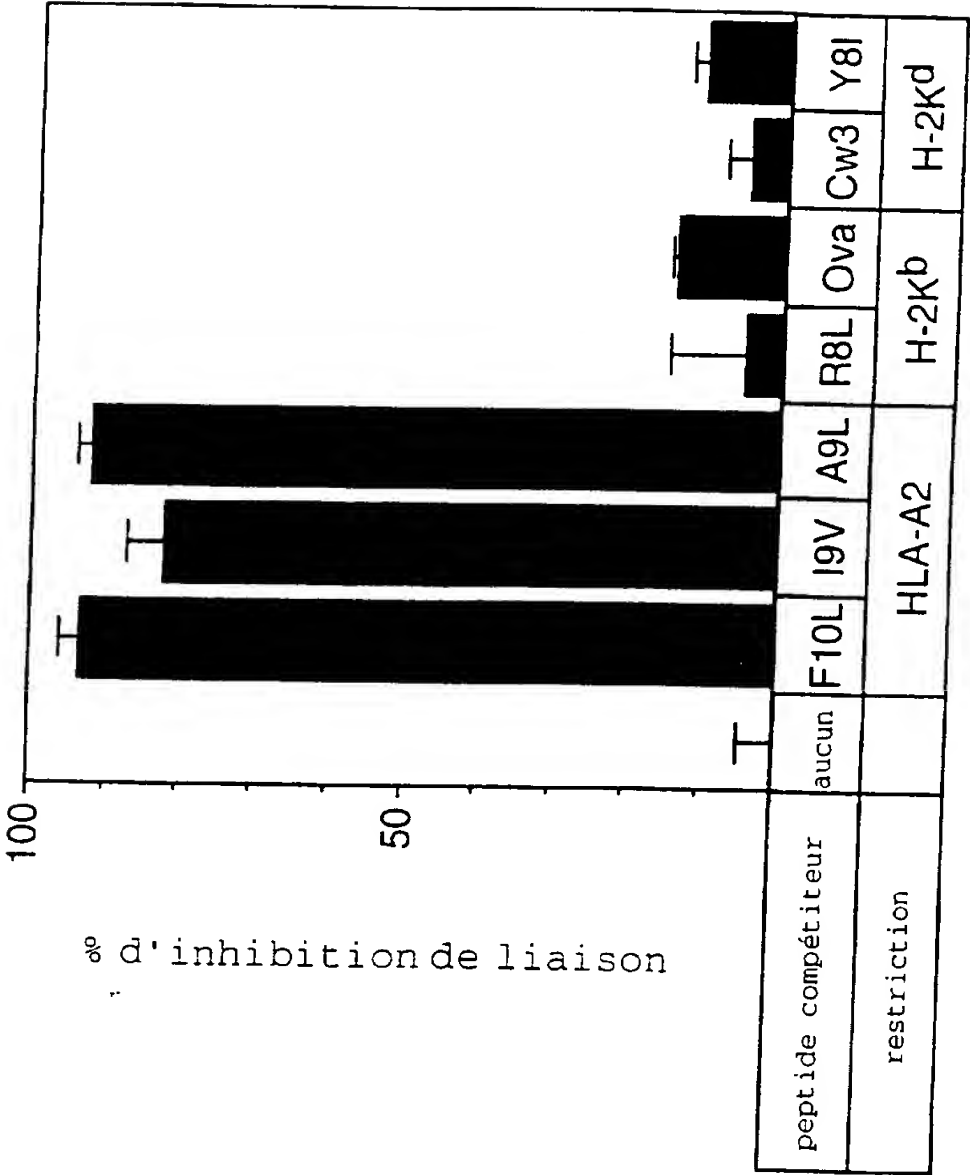


Figure 12



19/47

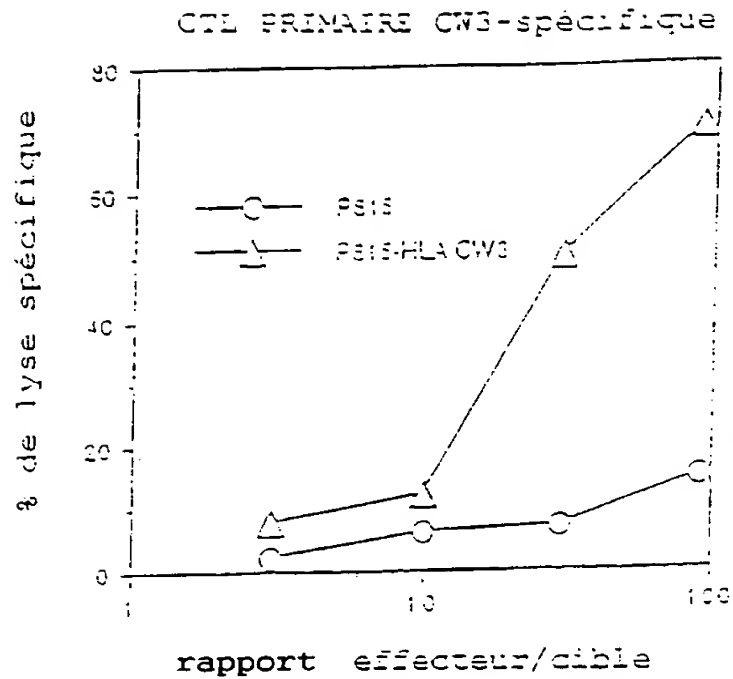


FIGURE 13 A

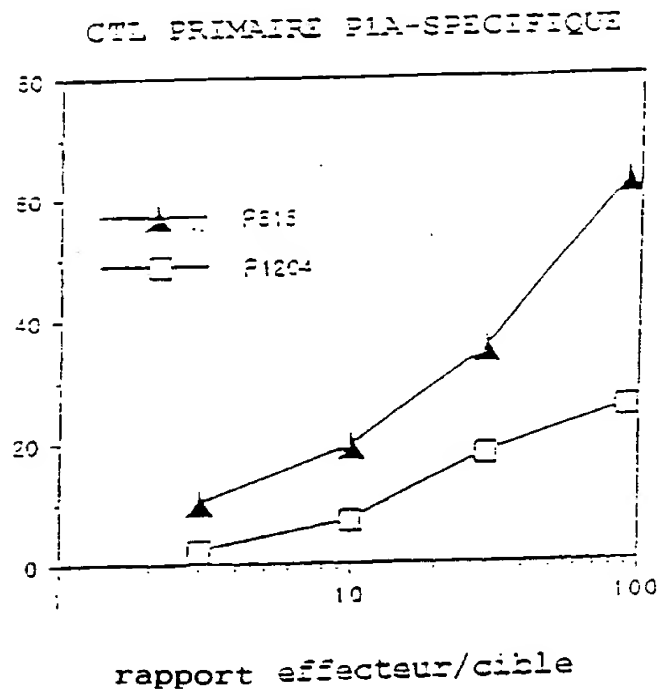


FIGURE 13 B

FEUILLE RECTIFIEE (REGLE 91)
ISA/EP

20/47

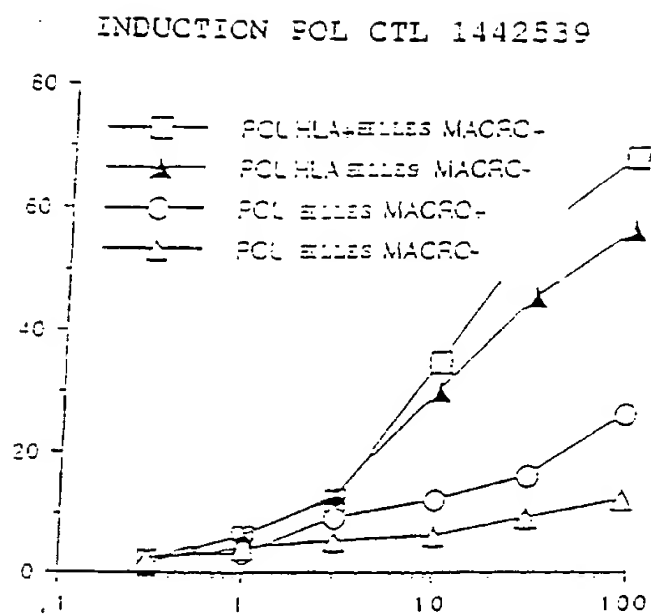
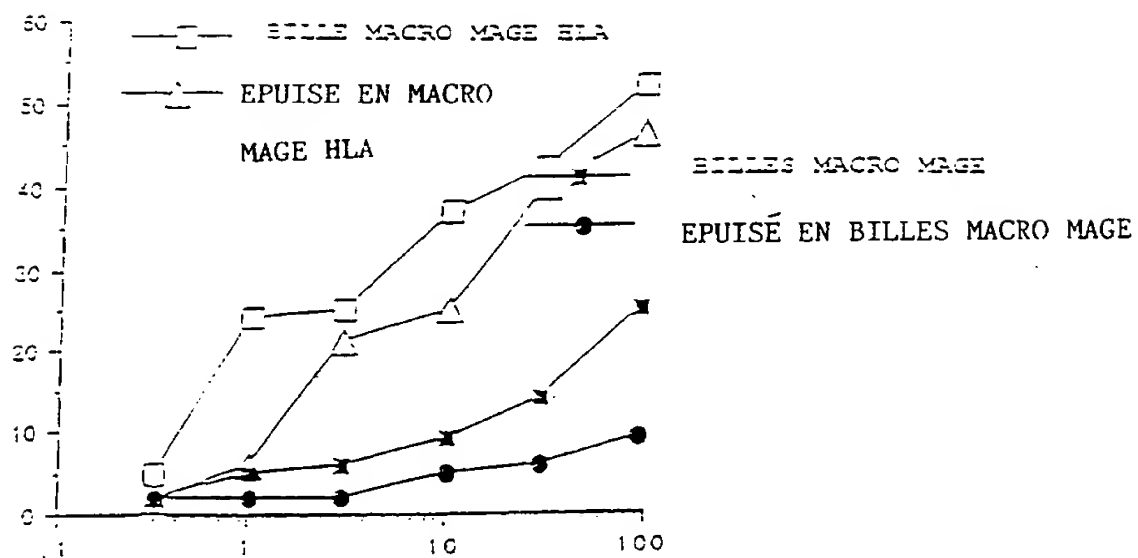


FIGURE 14

21/47

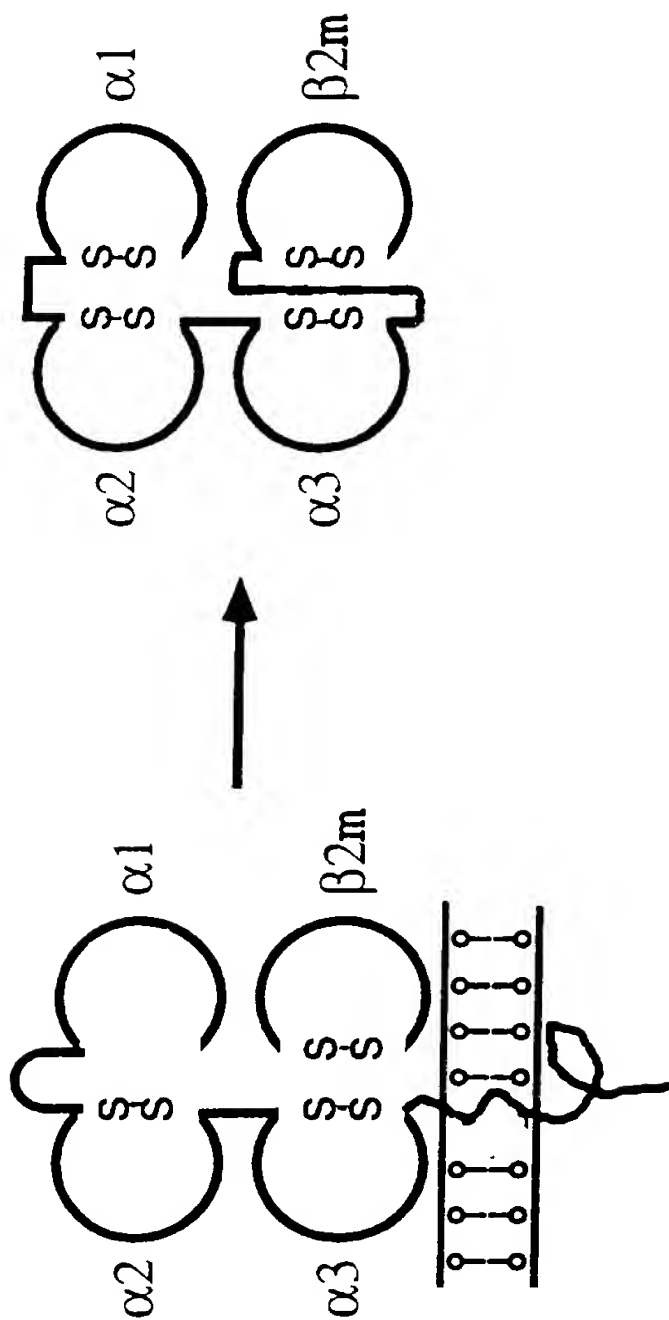
FIGURE 15

INDUCTION DE CTL PRIMAIRE MAGE-SPECIFIQUE (1442539)



22/47

FIGURE 16



23/47

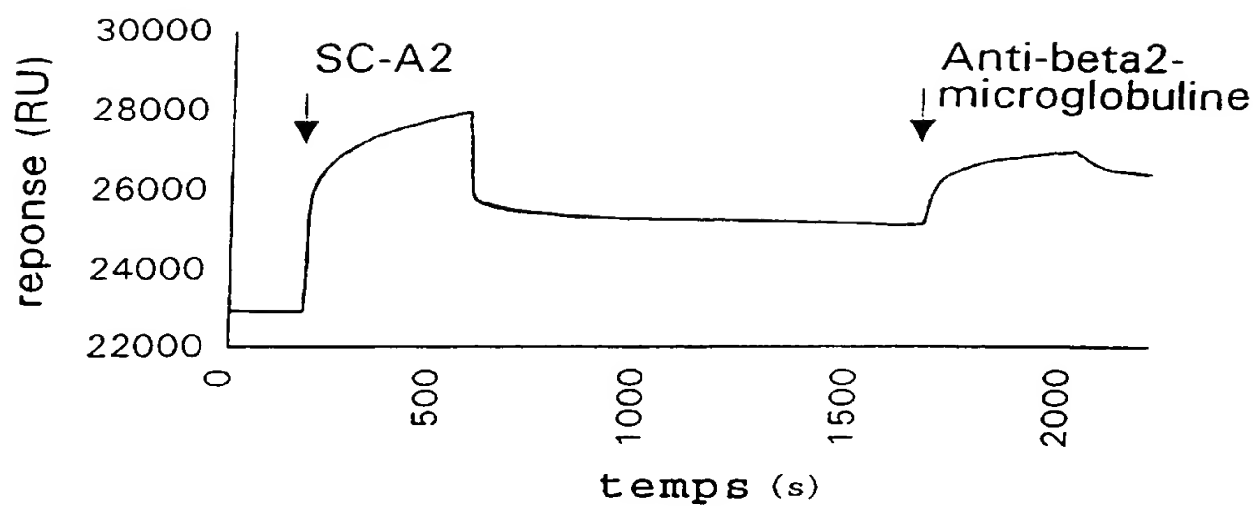
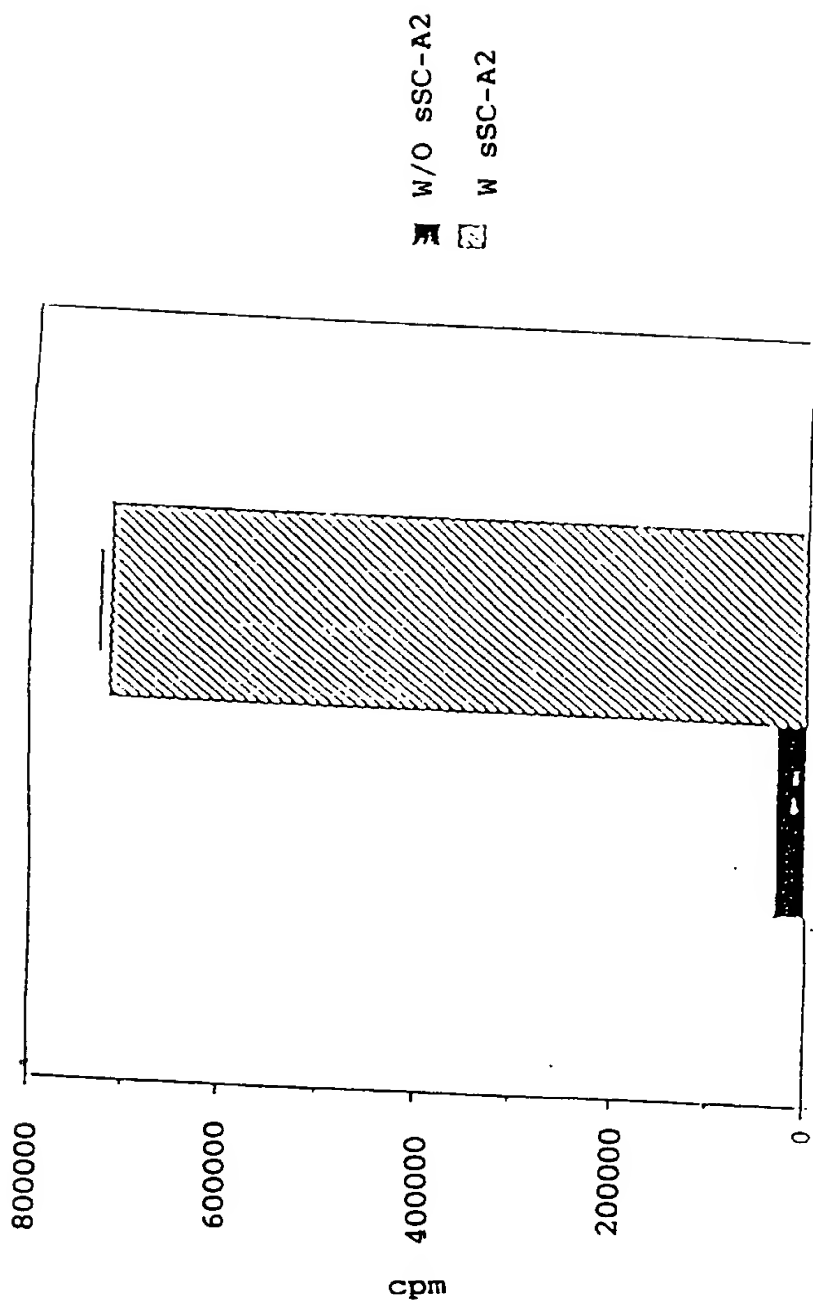


Figure 17

24/47

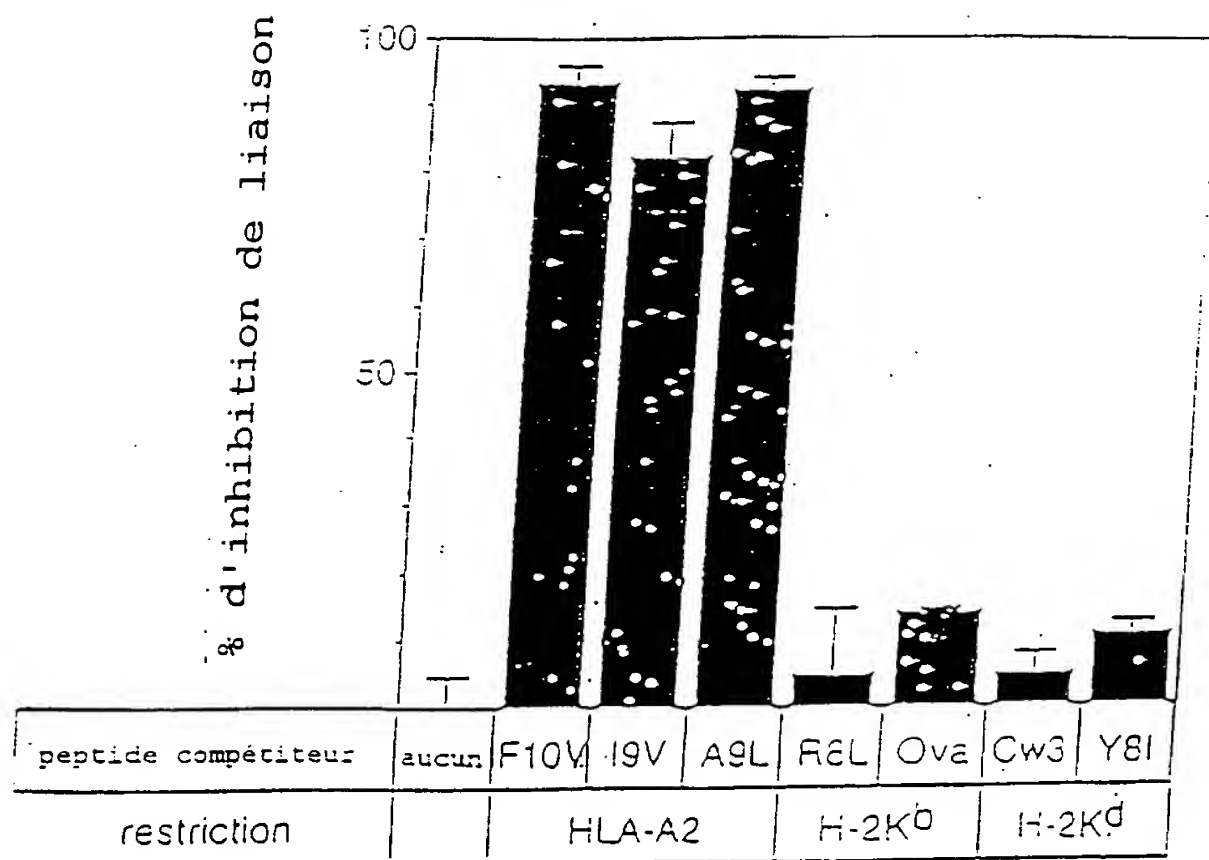
FIGURE 18 A



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

25/47

FIGURE 18 B



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

26/47

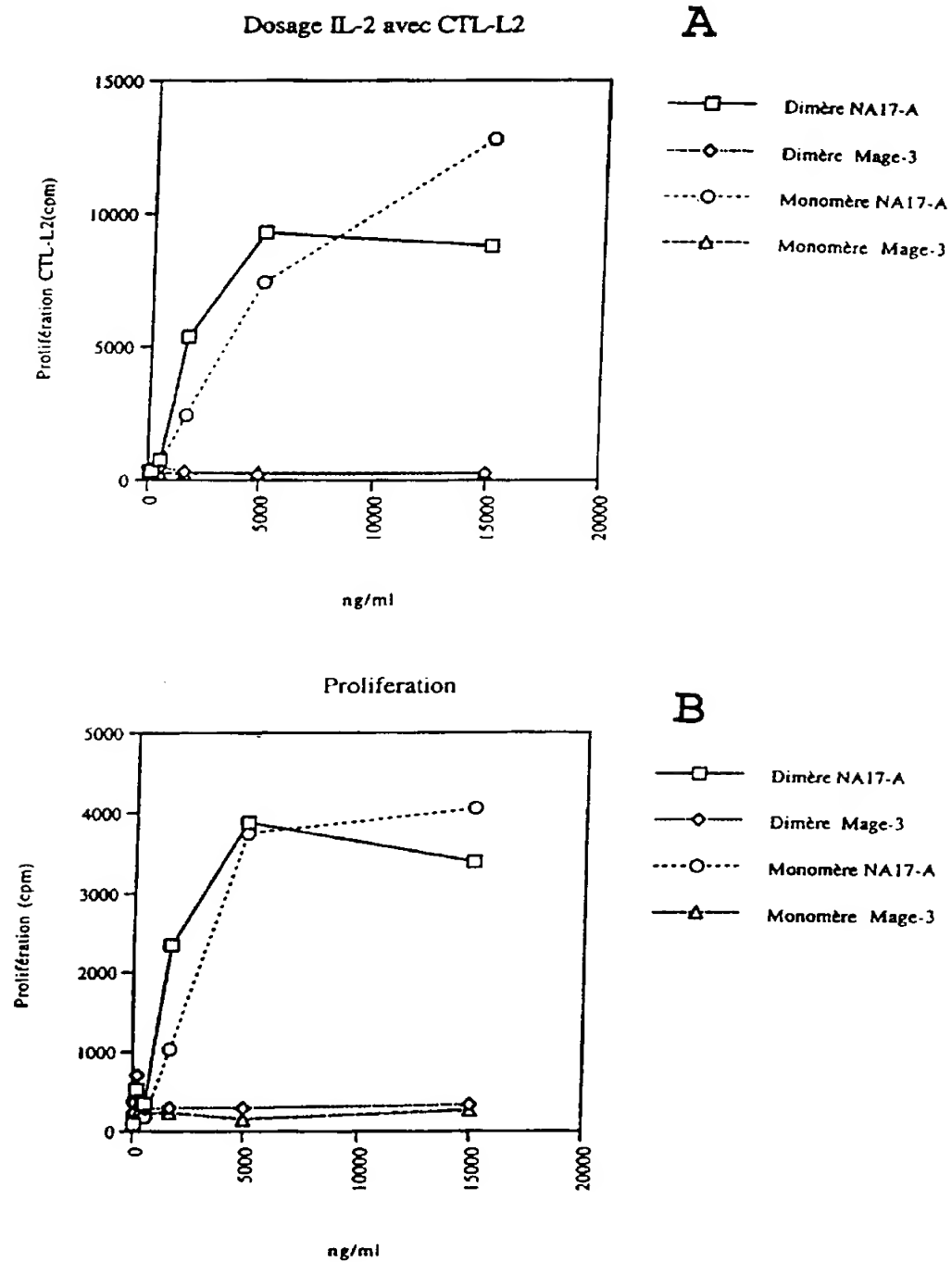


Figure 19

27/47

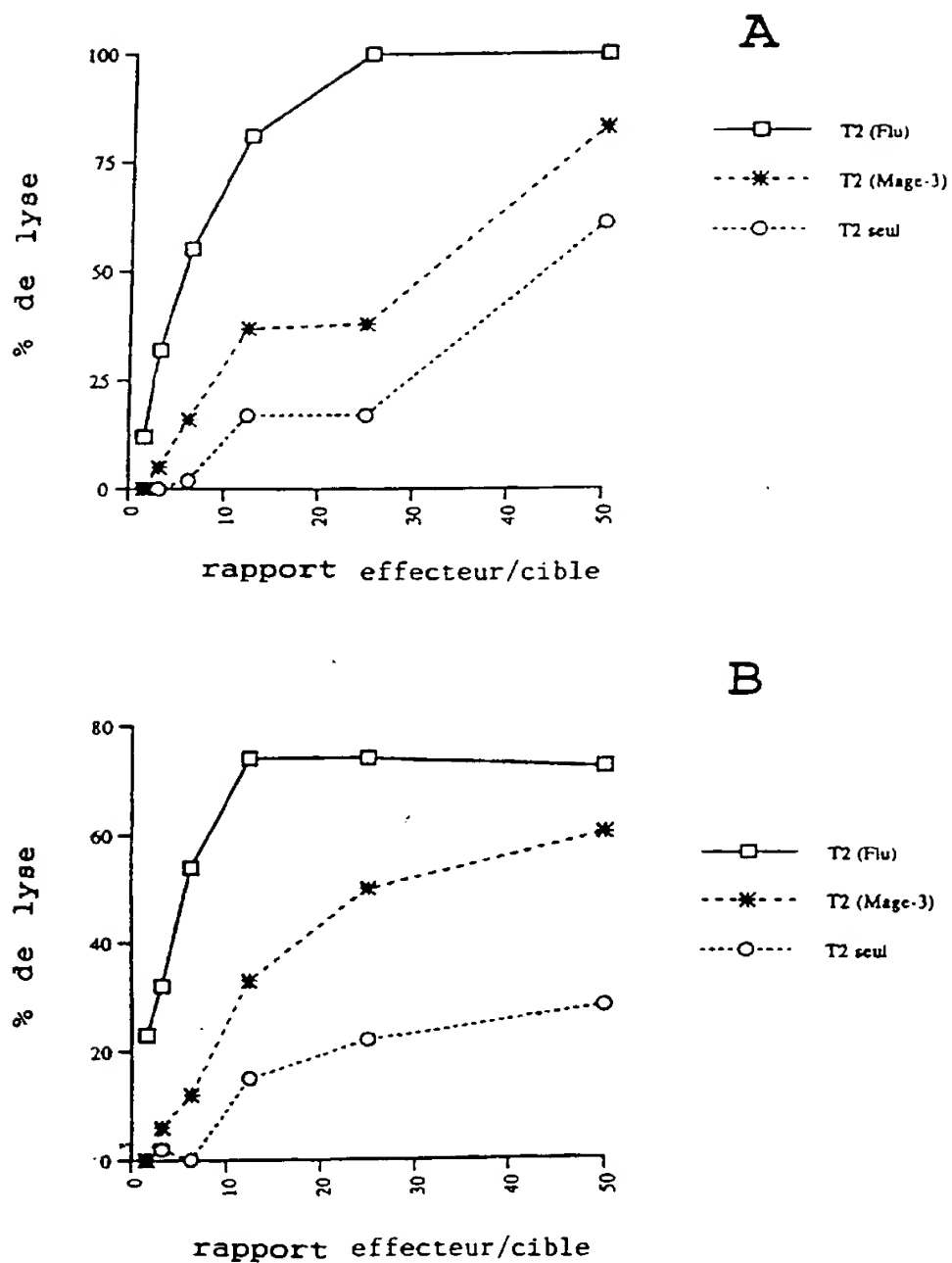


Figure 20

FEUILLE RECTIFIEE (REGLE 91)
ISA/EP

28/47

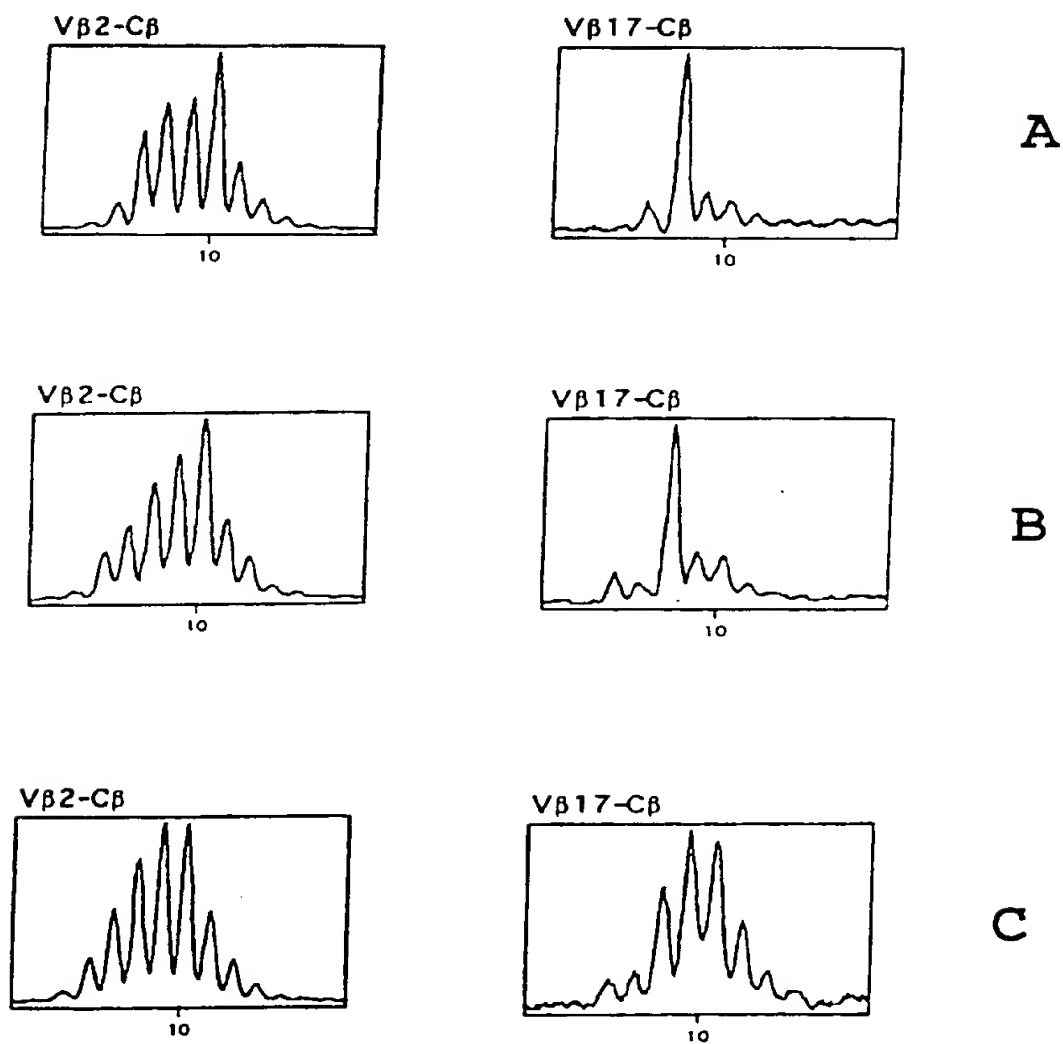


Figure 21

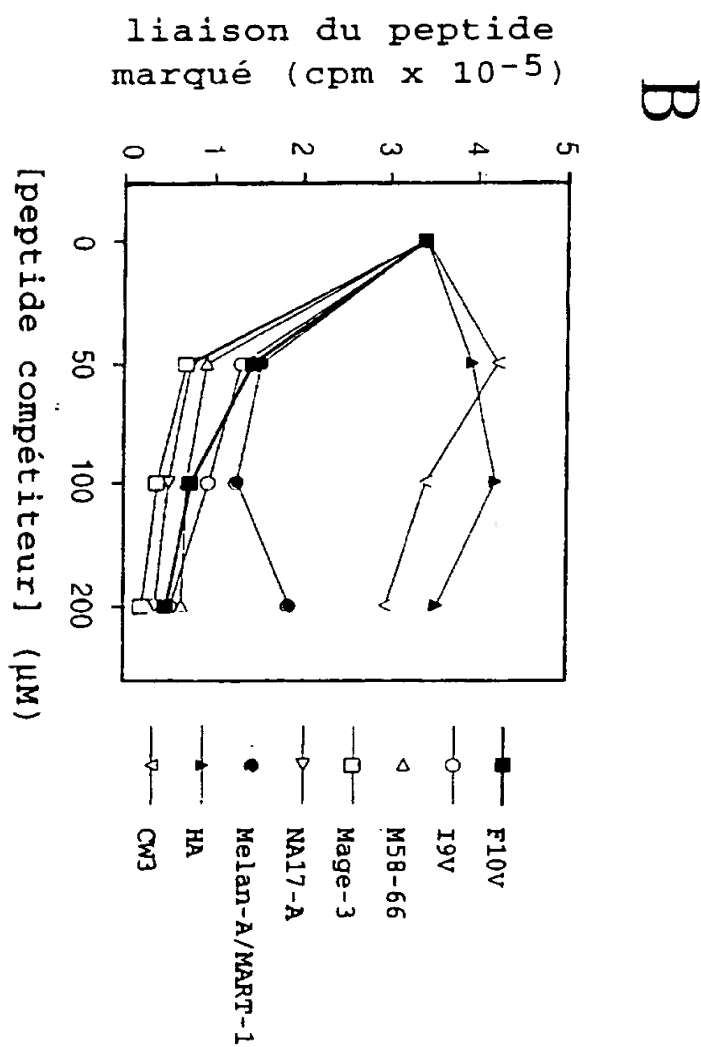
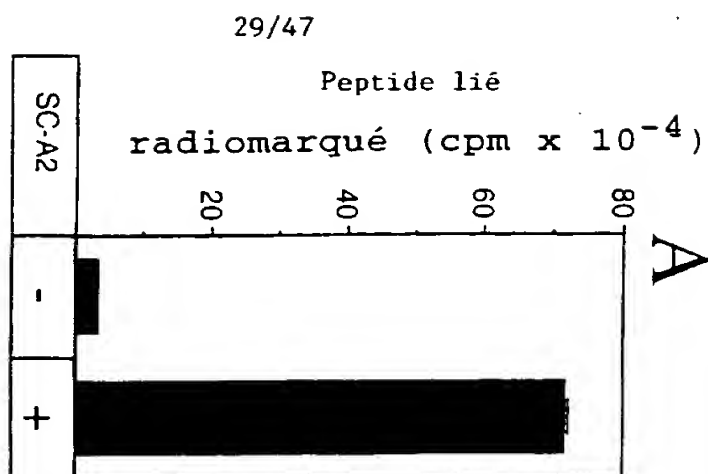


Figure 22

30/47

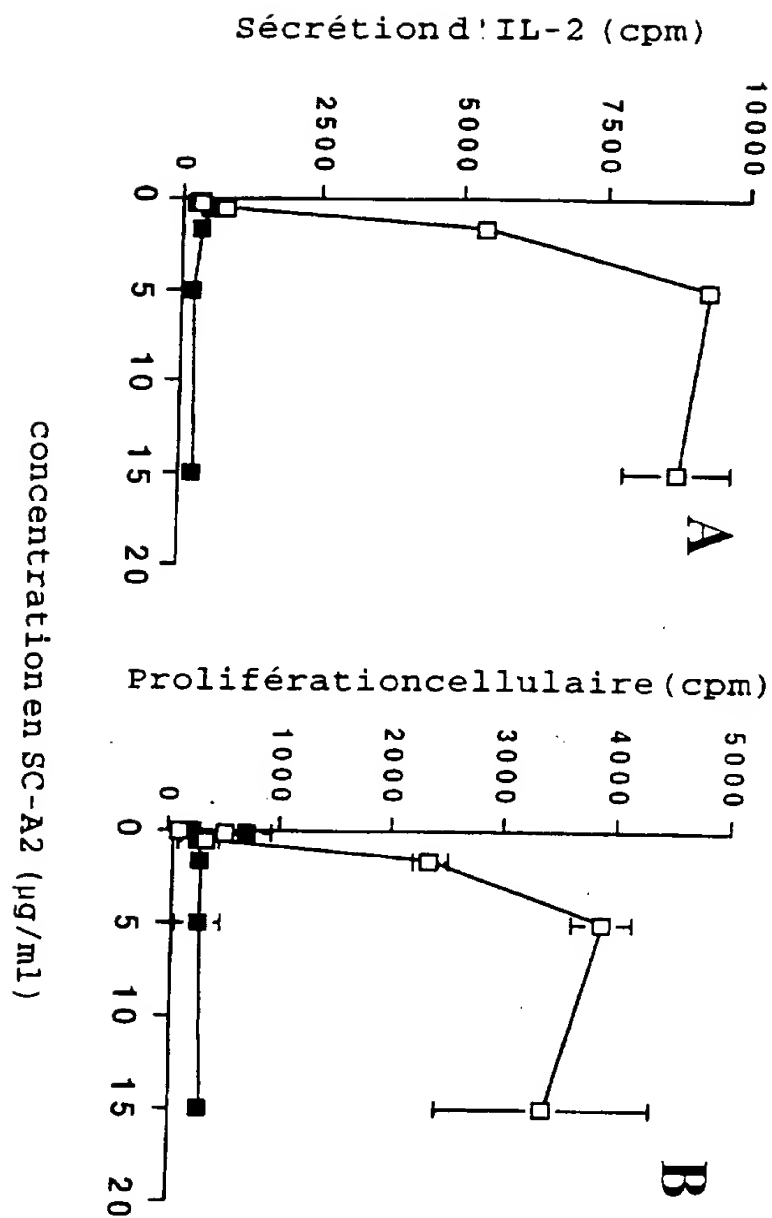
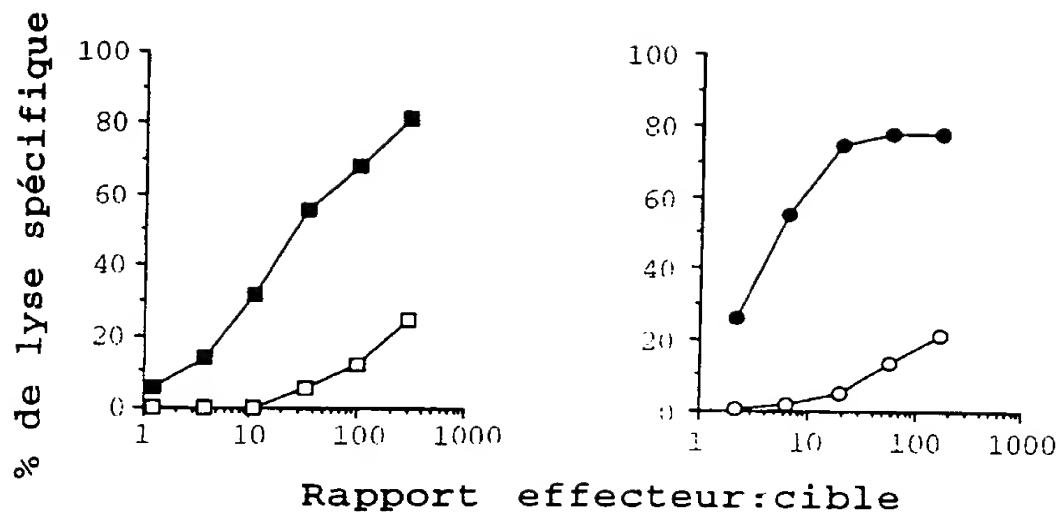


Figure 23

31/47

A



B

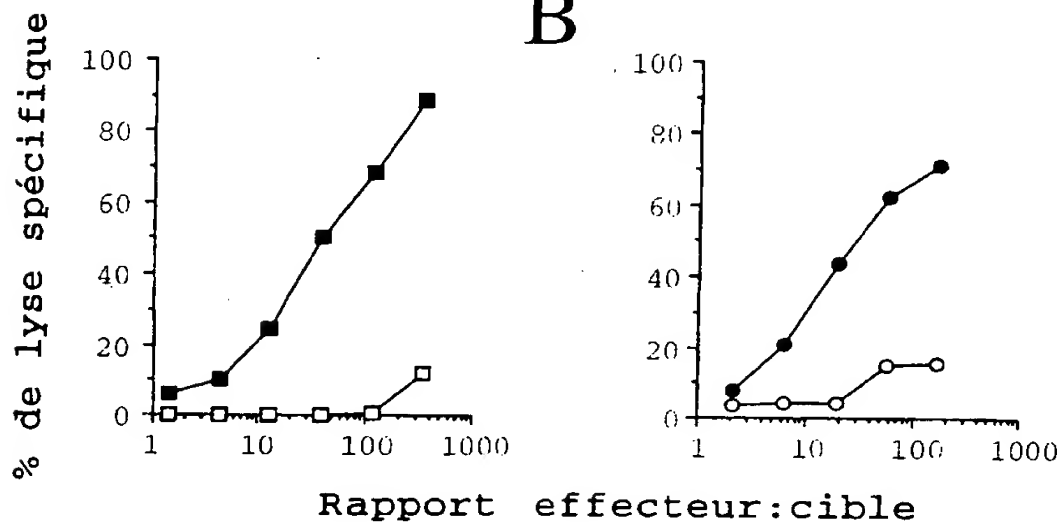


Figure 24

32/47

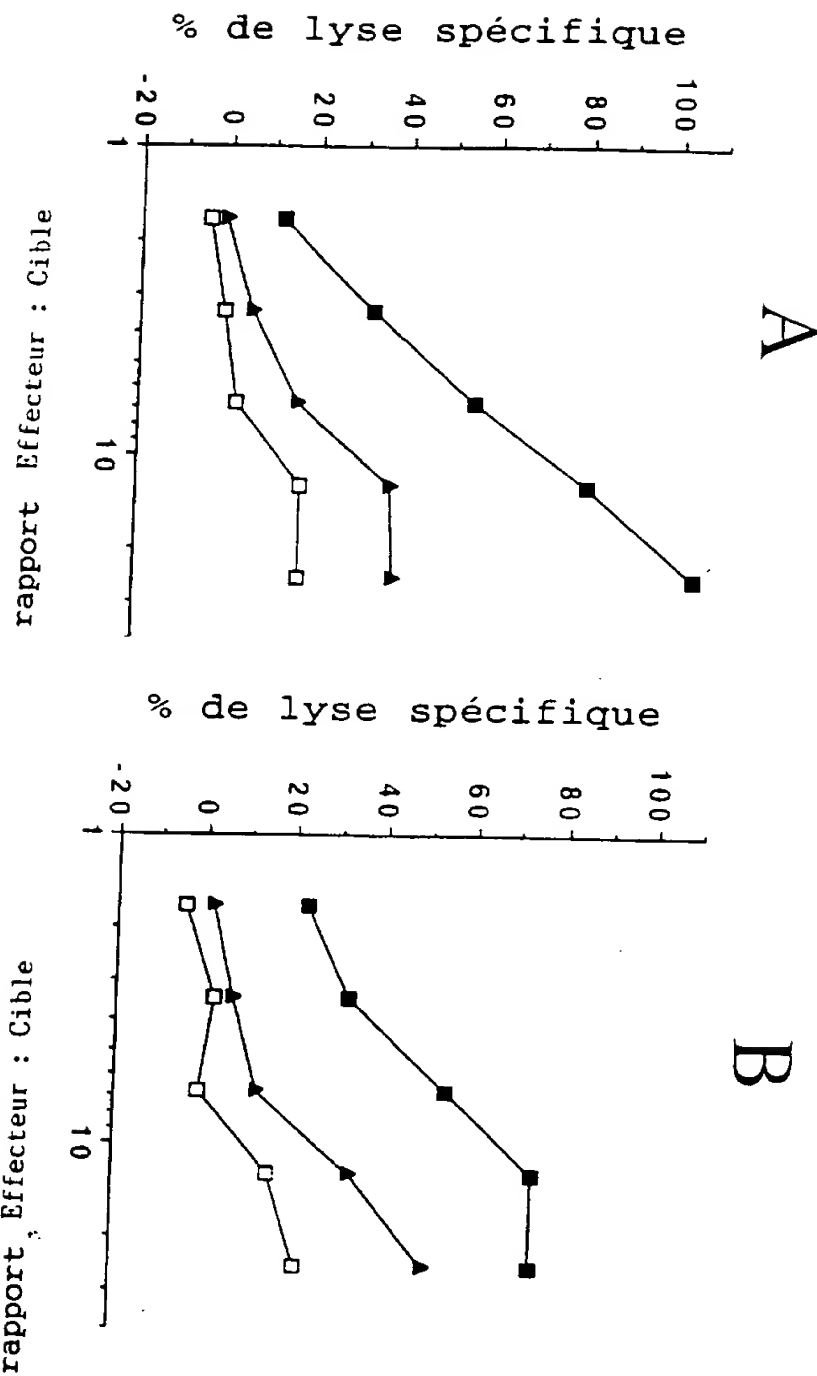


Figure 25

33/47

Ré-arrangements de chaîne TCR- β de CTL induits in vitro

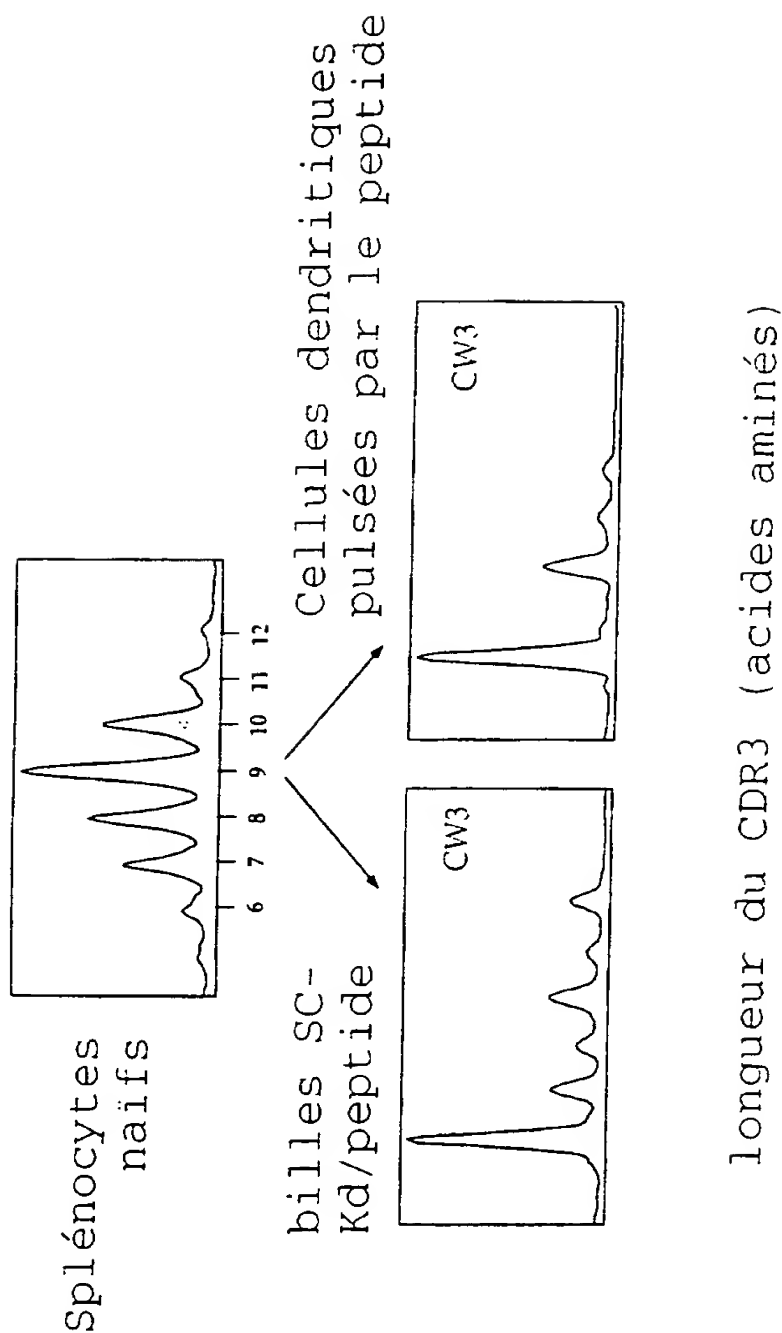
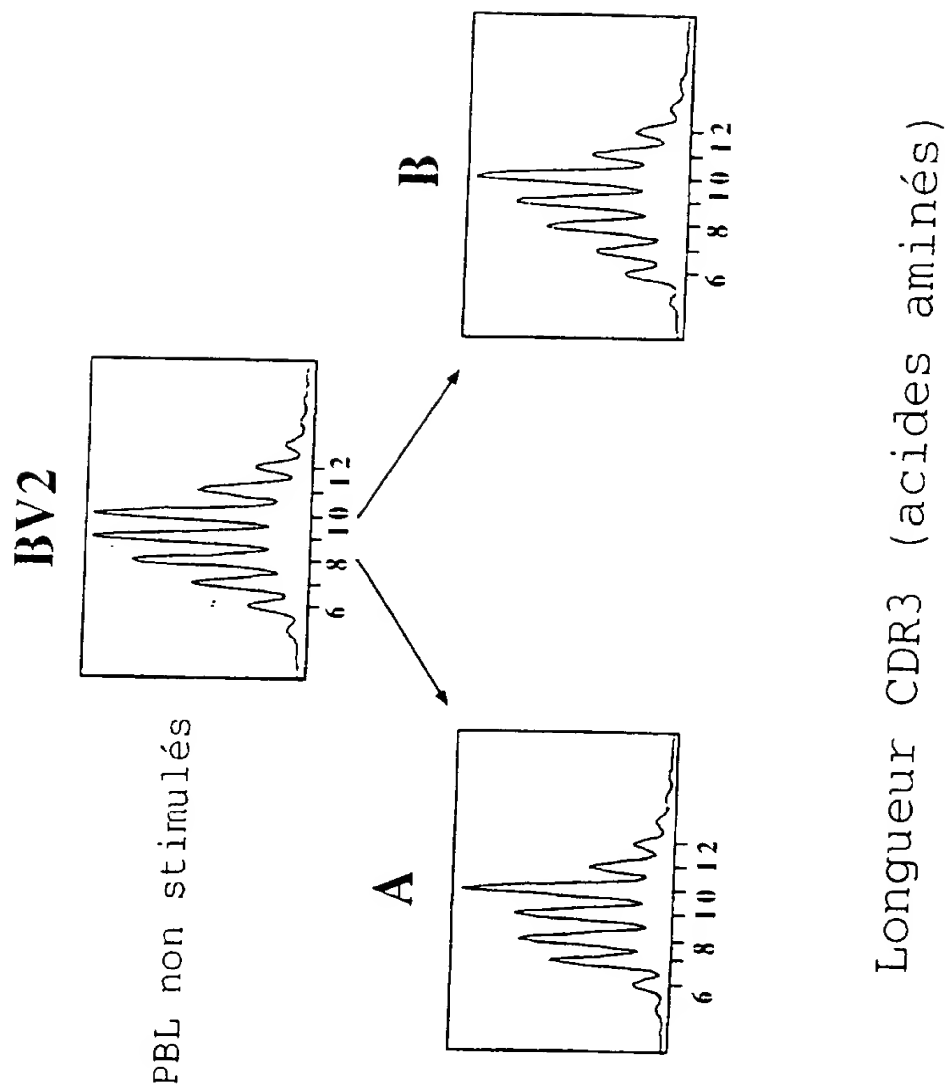


Figure 26

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

34/47

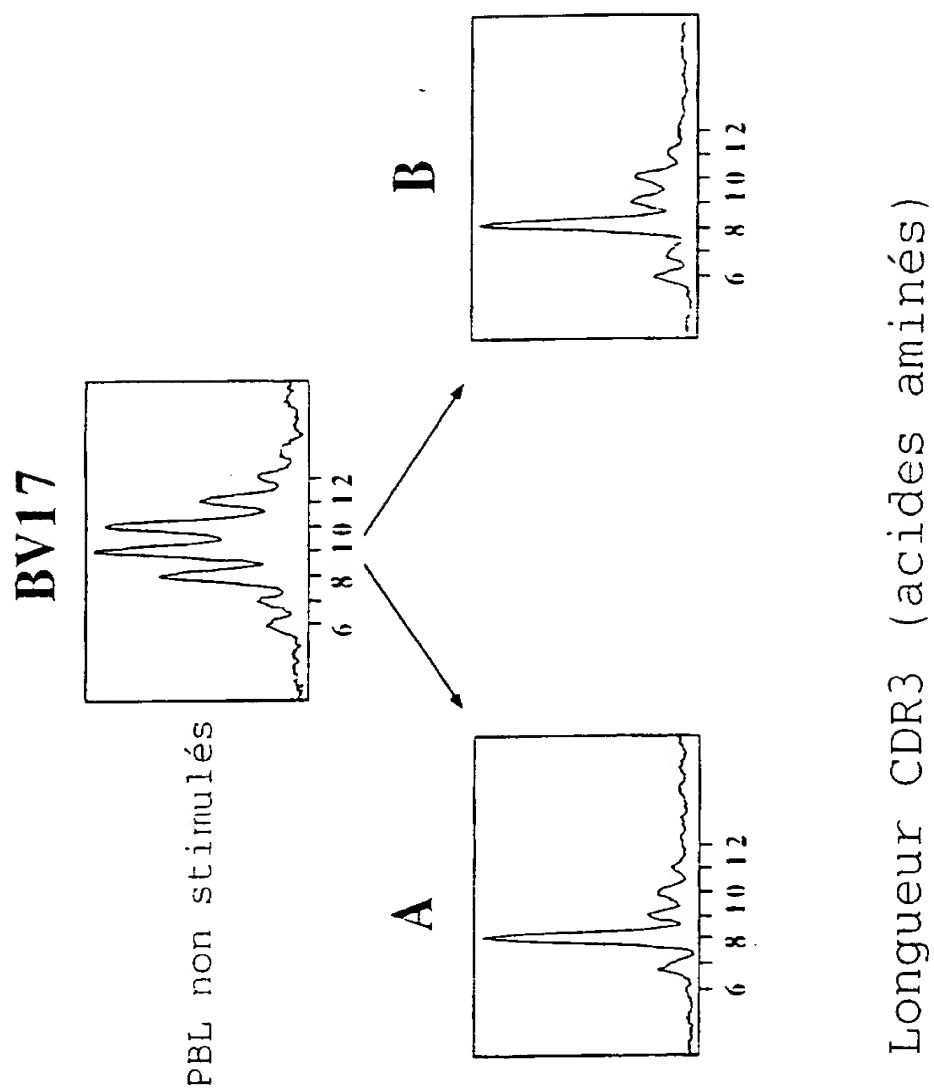
Figure 27



Intensité de fluorescence (unités arbitraires)

35/47

Figure 27 (Suite)



Intensité de fluorescence
(unités arbitraires)

36/47

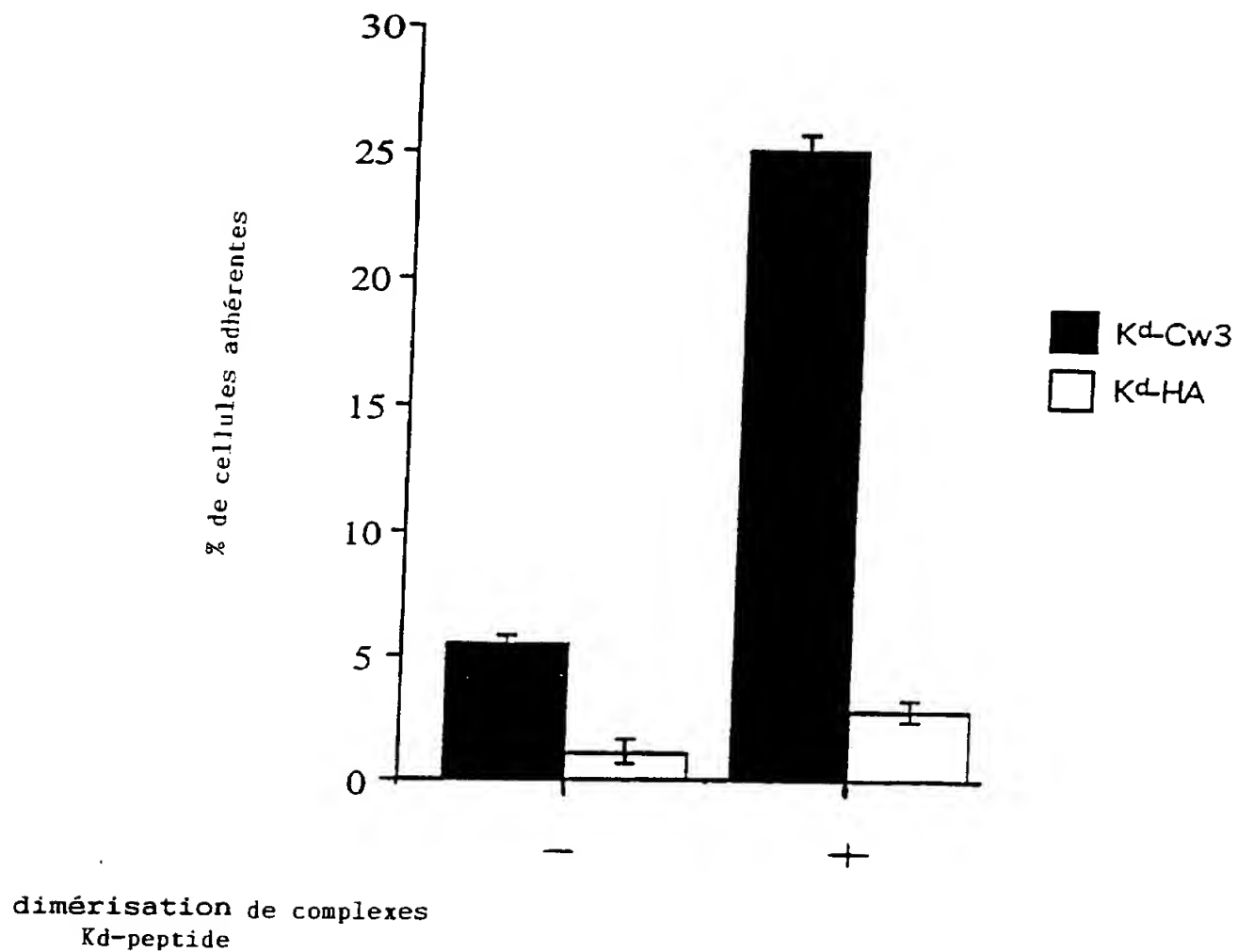


Figure 28

37/47

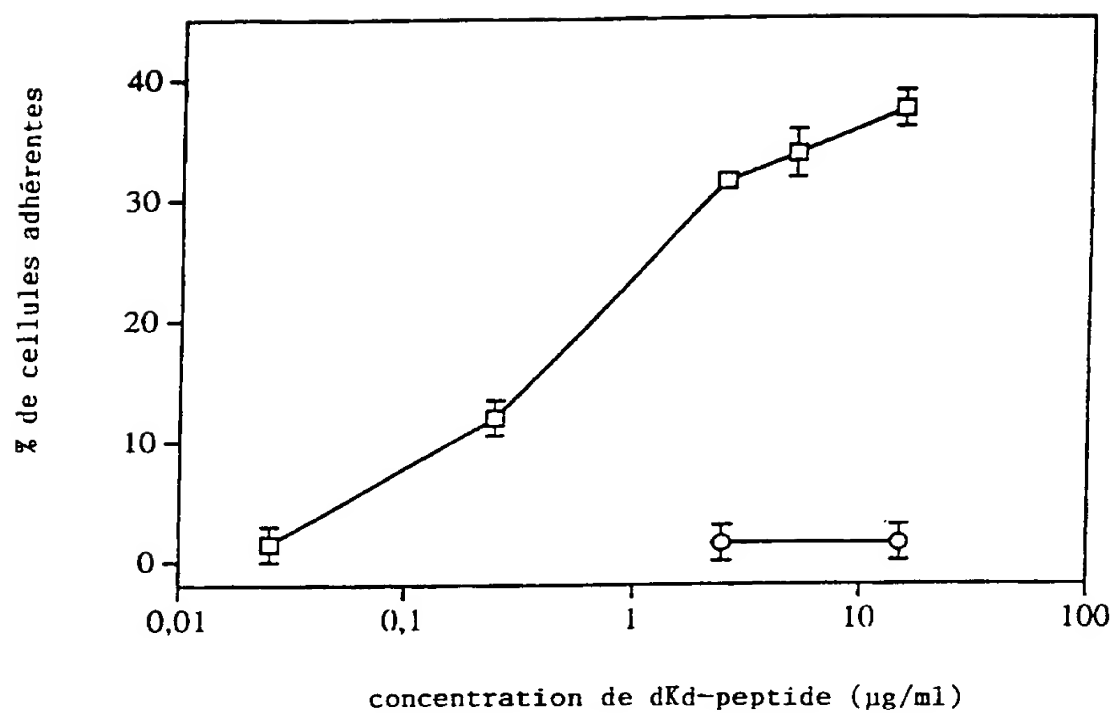
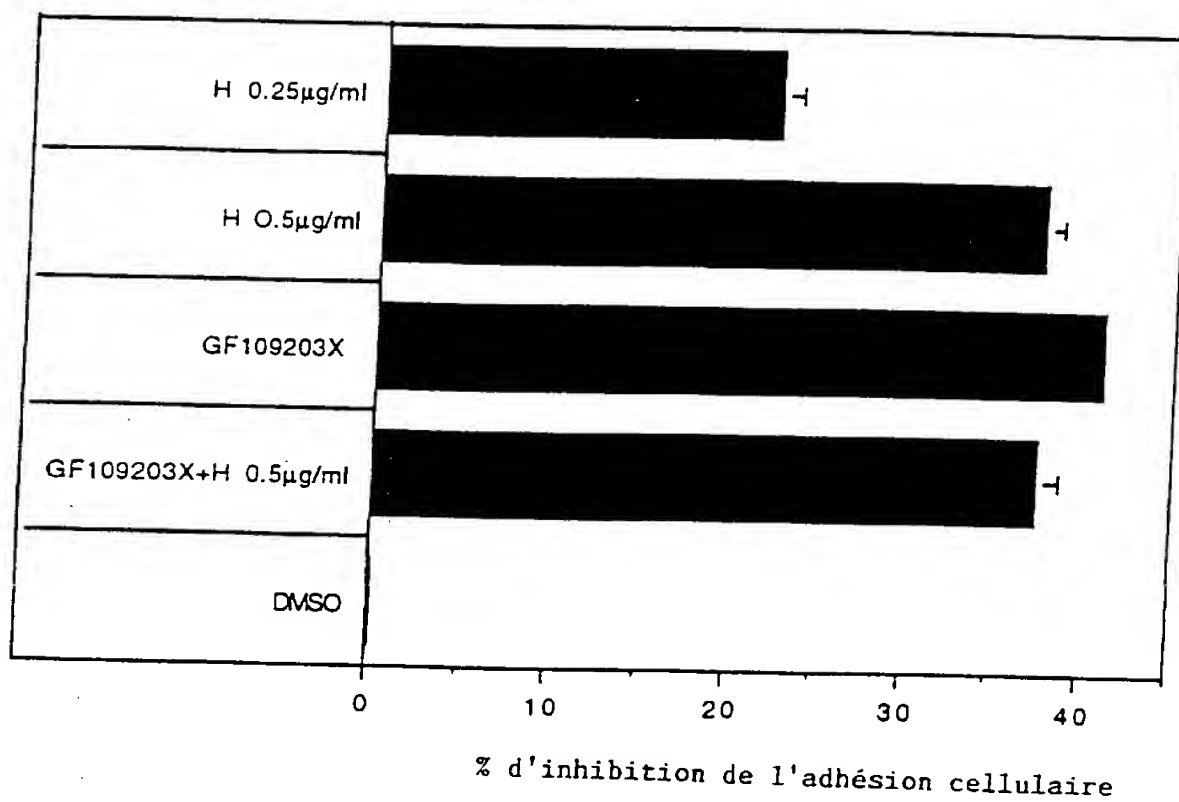


Figure 29

38/47

Figure 30



39/47

MELANGE

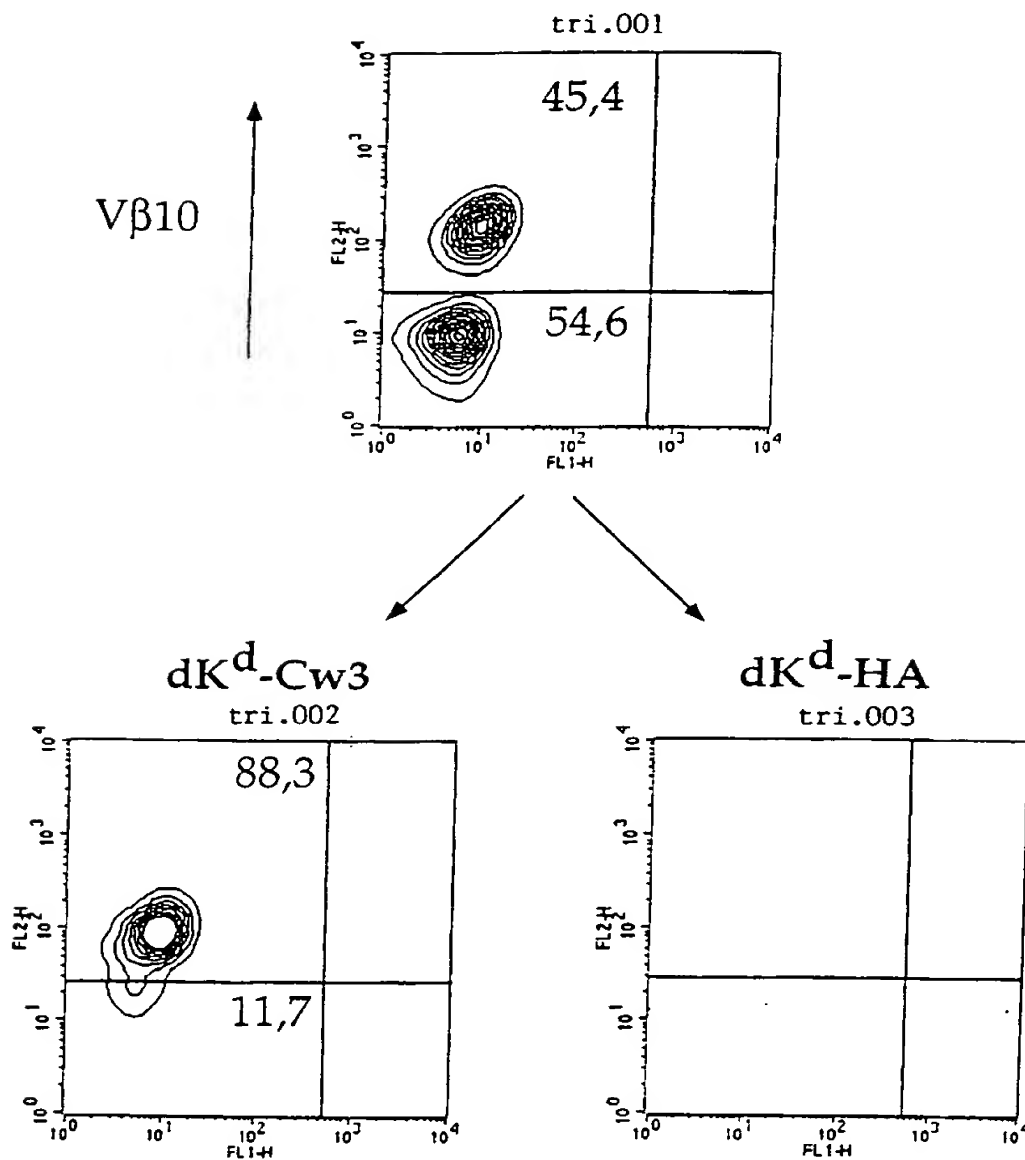


Figure 31

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

40/47

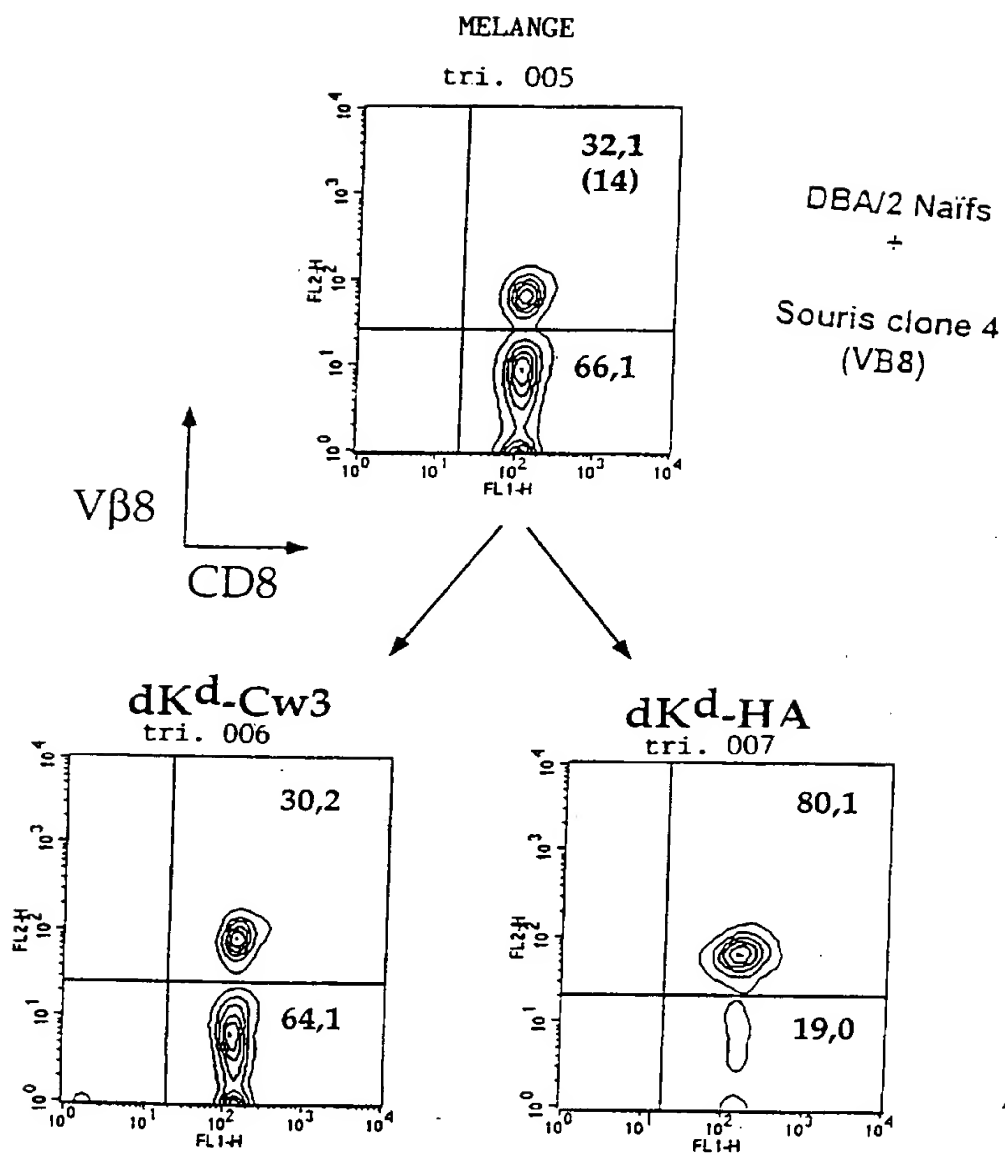


Figure 32

41/47

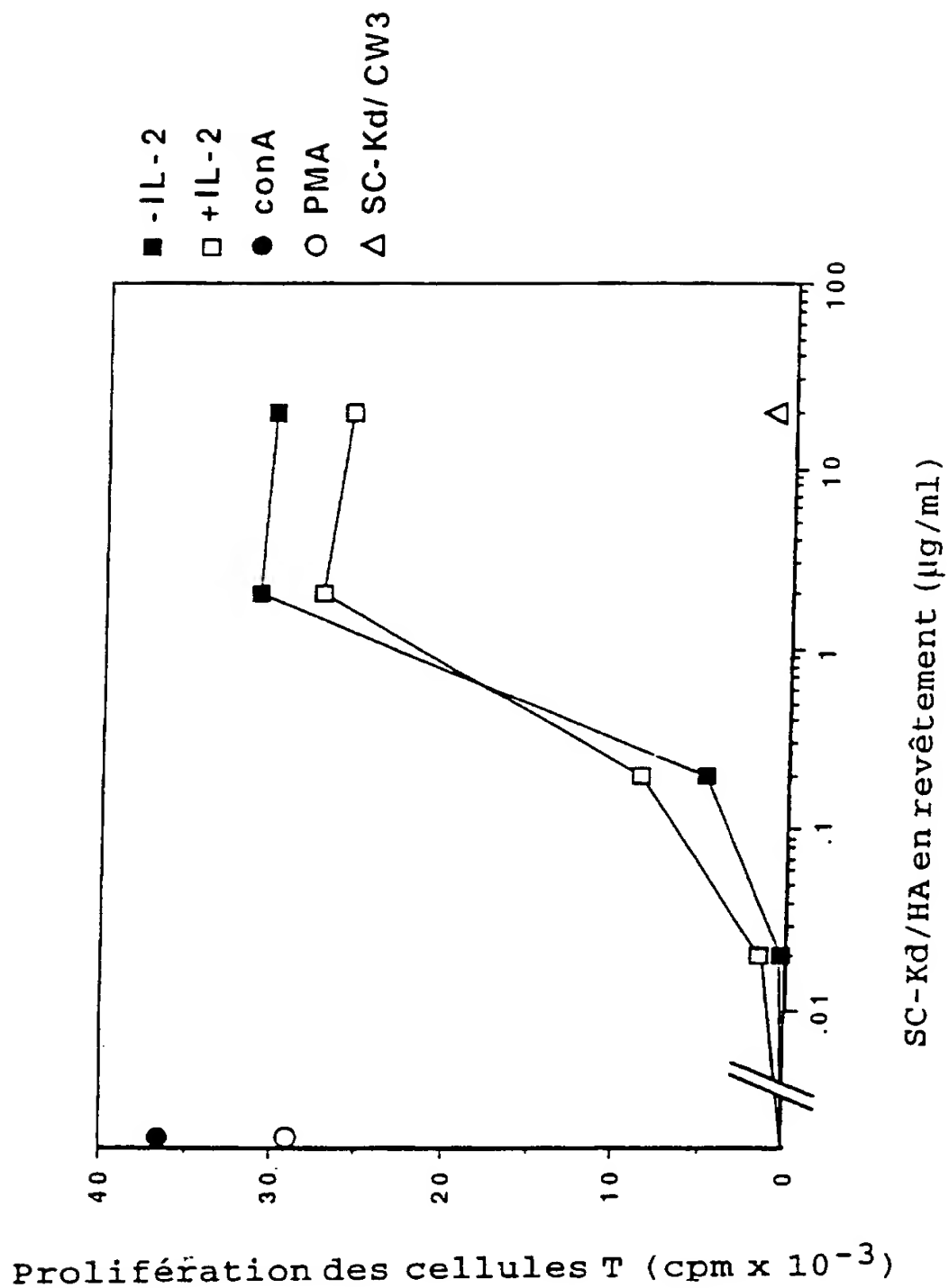


Figure 33

42/47

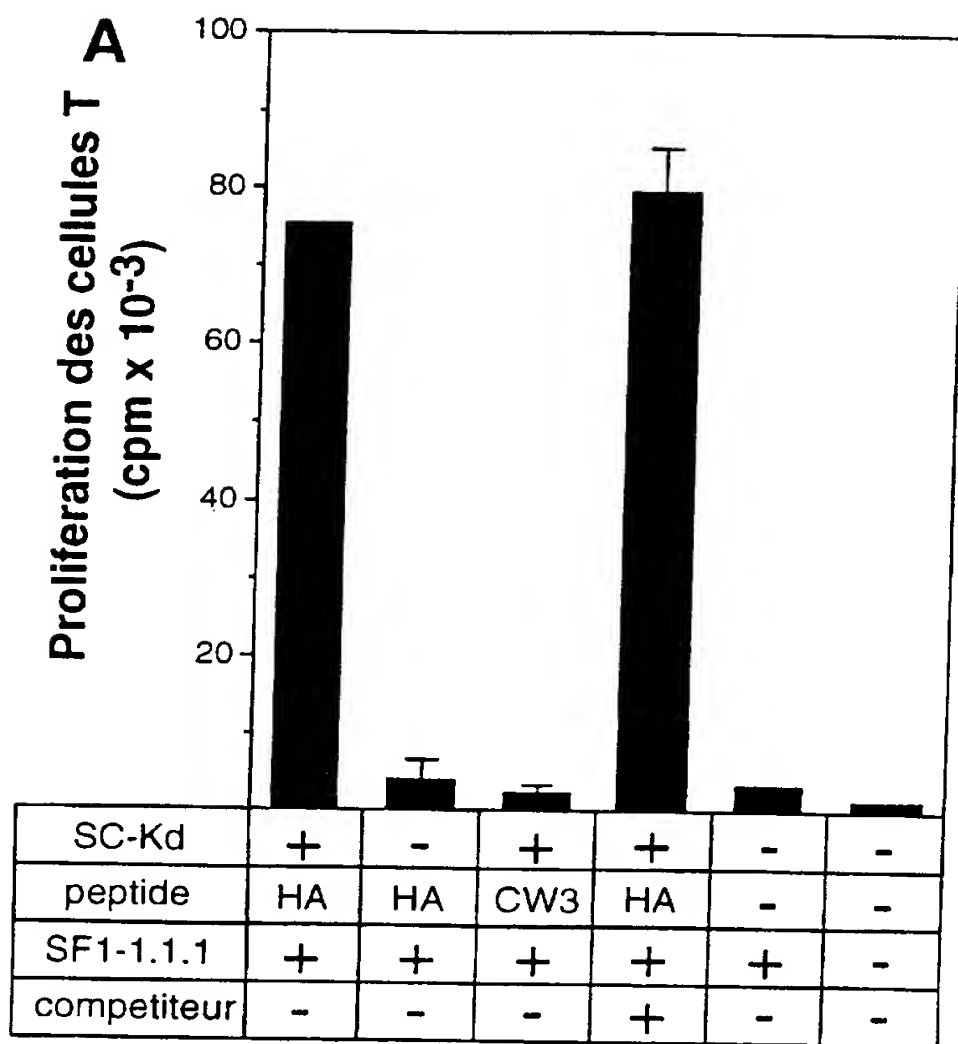


Figure 34A

43/47

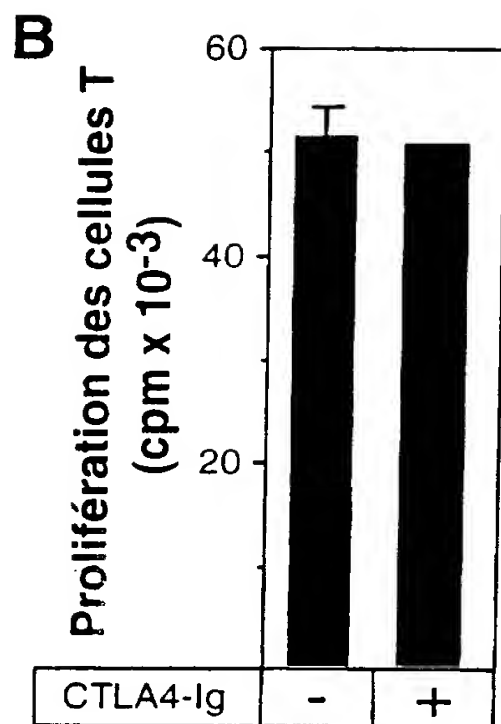


Figure 34B

44/47

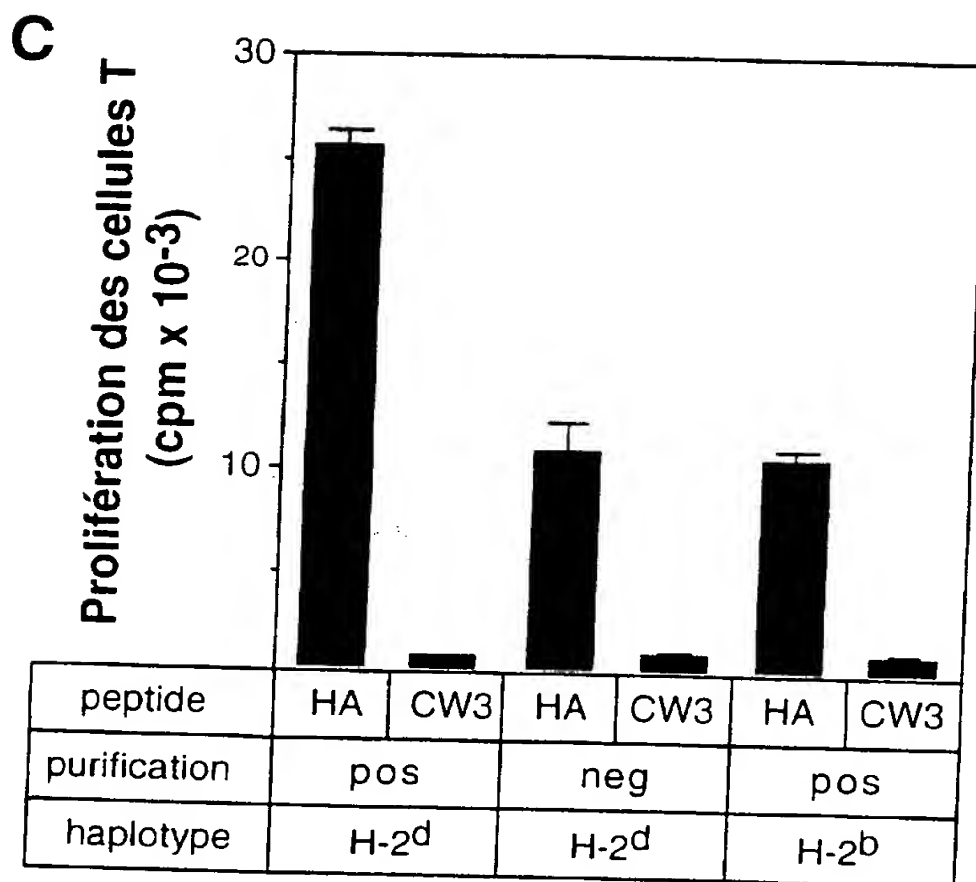


Figure 34C

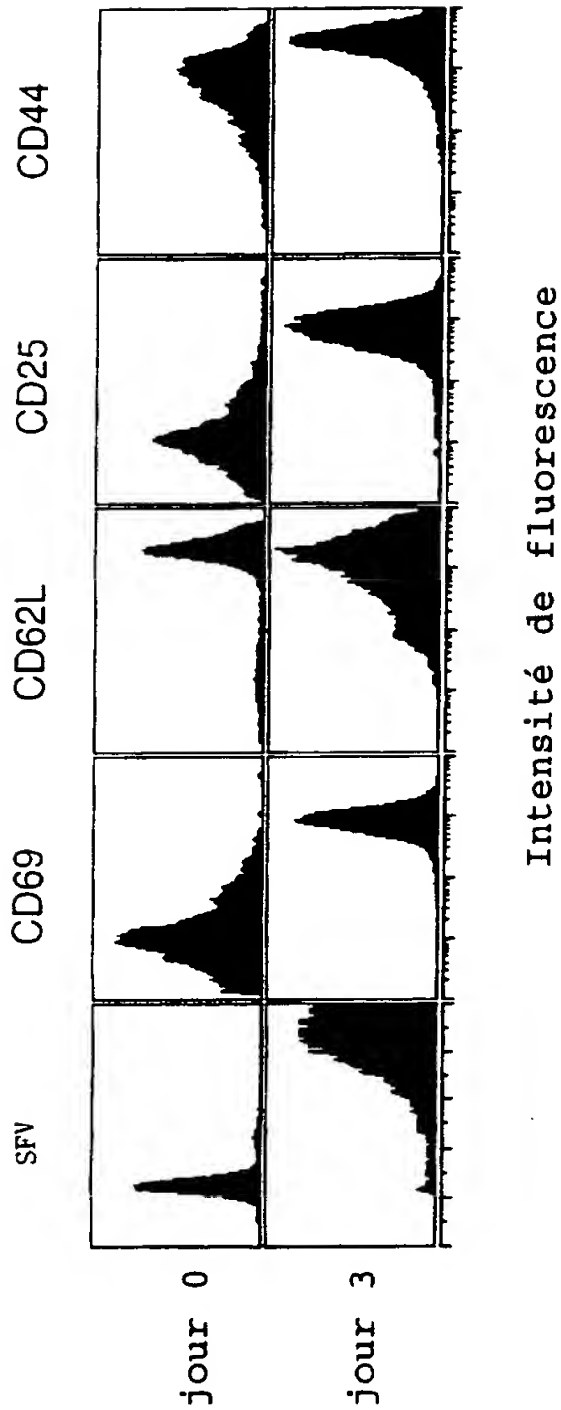
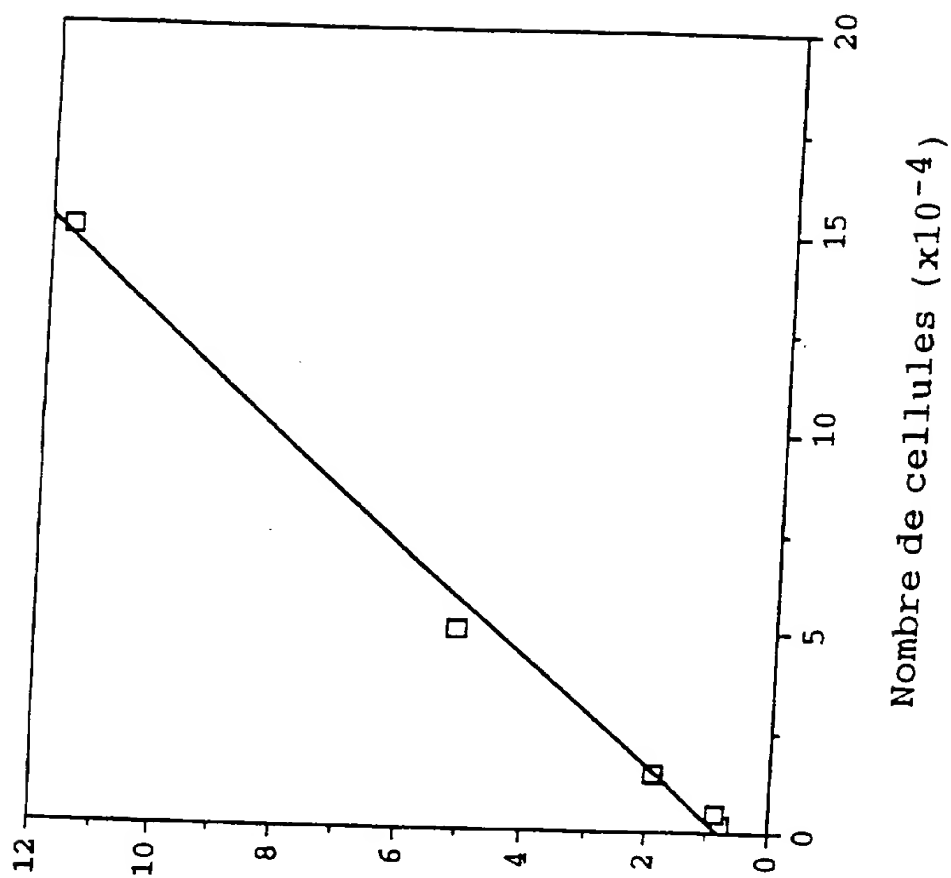


Figure 35

46/47

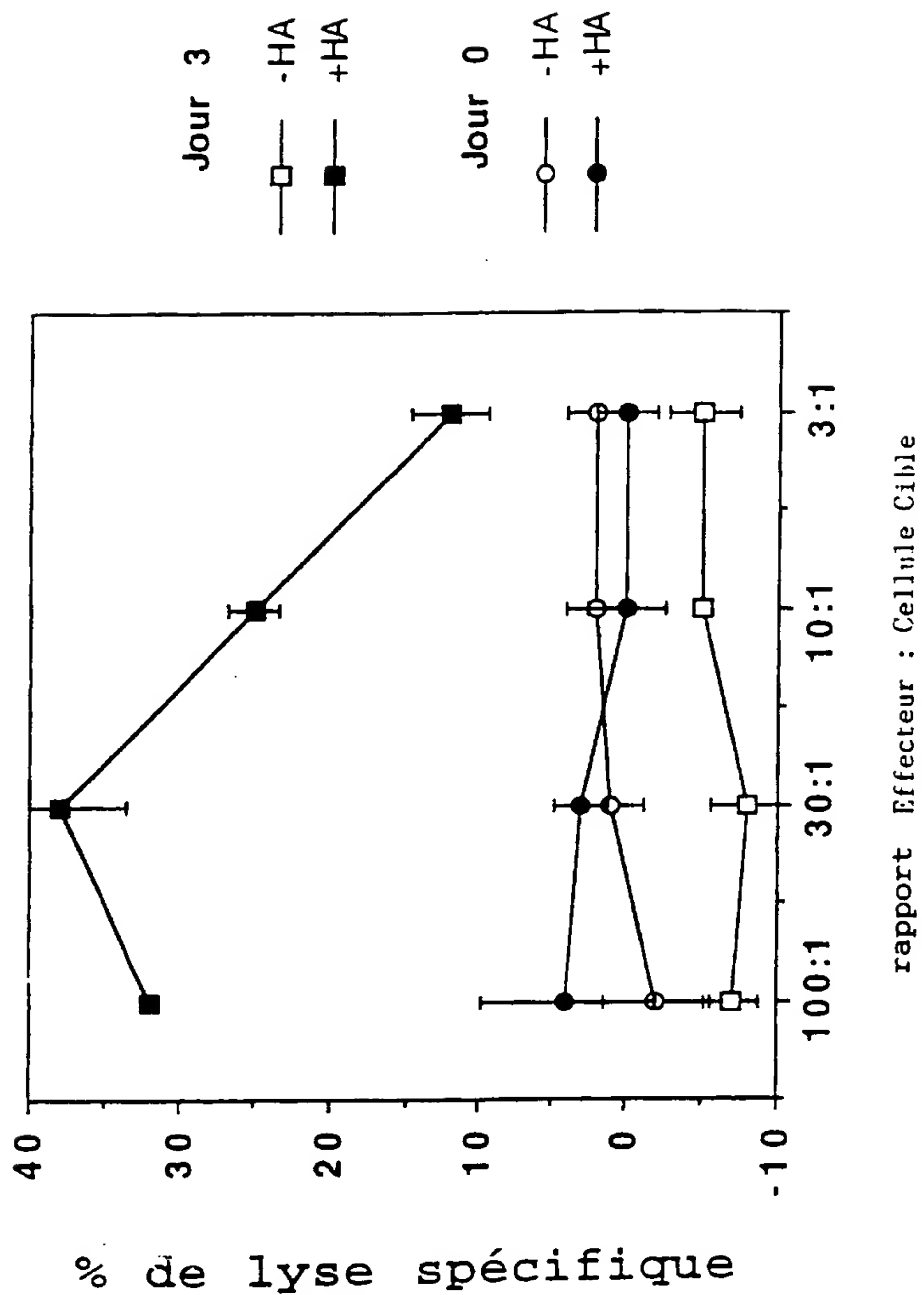
Figure 36



Prolifération des cellules T (cpm x 10⁻³)

47/47

FIGURE 37





DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 33/569, 33/574, C07K 14/705	A3	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/44667 (43) Date de publication internationale: 27 novembre 1997 (27.11.97)
--	-----------	---

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00892
(22) Date de dépôt international: 21 mai 1997 (21.05.97)

(30) Données relatives à la priorité:
08/651.925 21 mai 1996 (21.05.96) US

(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25, rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15 (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LANGLADE-DEMOYEN, Pierre [FR/FR]; 18, rue B. Shaw, F-75015 Paris (FR). LONE, Yu-Chun [FR/FR]; 11, rue Béliard, F-75017 Paris (FR). KOURILSKY, Philippe [FR/FR]; 26, rue de Montpensier, F-75001 Paris (FR). ABASTADO, Jean-Pierre [FR/FR]; 33, rue de Croustadt, F-75015 Paris (FR).

(74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Ainé, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:
19 mars 1998 (19.03.98)

(54) Title: METHOD FOR USING PEPTIDE COMPLEXES/MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX TO OBTAIN OR PURIFY ANTIGEN-SPECIFIC T CELLS AND TO STIMULATE T CELLS

(54) Titre: METHODES D'UTILISATION DE COMPLEXES PEPTIDE/COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE POUR OBTENIR OU PURIFIER DES CELLULES T ANTIGENE-SPECIFIQUES ET POUR STIMULER DES CELLULES T

(57) Abstract

The invention features methods for using MHC/peptide complexes. The successful peptide-specific T lymphocyte purification by adsorption on a solid support coupled with a high density of MHC recombinant molecules, charged with a single peptide is disclosed. This method has enabled the isolating, purifying and quantifying of tumoral specific T lymphocytes, from peritoneal exudate and tumor-infiltrating lymphocytes. These purified T lymphocyte populations can be further multiplied *in vitro*. The resulting cells show a superior cytotoxic activity and an enhanced anti-tumoral action by re-injection in the tumor carrier. This novel approach is important for analysing the T lymphocytes repertoire at the peptide specificity level and to improve novel T lymphocyte adoptive immunotherapy based therapeutic treatments. Further, the MHC/peptide specific complexes can induce or stimulate peptide-specific T lymphocytes. Thus are also disclosed methods to induce cytotoxic T lymphocytes (CTL). These CTL can be used in turn to fight tumoral cell growth *in vitro* or *in vivo*. The MHC recombinant molecule charged with a single peptide can be effectively used in polymer form to stimulate specific immune response *ex vivo* or *in vivo* after being injected in man or animal.

(57) Abrégé

La présente invention concerne des méthodes d'utilisation de complexes CMH/peptide. On décrit la purification réussie de lymphocytes T peptide-spécifiques par adsorption sur un support solide couplé à une densité élevée de molécules recombinantes du CMH, chargées d'un seul peptide. Cette méthode a permis d'isoler, purifier et quantifier des lymphocytes T spécifiques de tumeur, à partir d'échantillons d'exsudat péritonéal et de lymphocytes infiltrant des tumeurs. Ces populations de lymphocytes T purifiés peuvent être encore multipliées *in vitro*. Les cellules résultantes présentent une activité cytotoxique supérieure et une action anti-tumorale accrue par réinjection au porteur de la tumeur. Cette nouvelle approche est importante pour analyser le répertoire de lymphocytes T au niveau de la spécificité peptidique et pour améliorer de nouveaux traitements thérapeutiques basés sur l'immunothérapie adoptive à lymphocytes T. De plus, les complexes spécifiques CMH/peptide peuvent induire ou stimuler des lymphocytes T peptide-spécifiques. Ainsi, on décrit également des méthodes destinées à induire des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Ces CTL peuvent être utilisés à leur tour pour combattre la croissance des cellules tumorales *in vitro* ou *in vivo*. La molécule CMH recombinante chargée avec un seul peptide peut être utilisée avec efficacité sous forme polymère pour stimuler une réponse immune spécifique *ex vivo* ou *in vivo* après injection à l'homme ou l'animal.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PI	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No.
PCT/FR 97/00892

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N33/569 G01N33/574 C07K14/705		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>F. GODEAU ET AL.: "Purification and ligand binding of a soluble class I major histocompatibility complex molecule consisting of the first three domains of H-2Kd fused to beta2-microglobulin expressed in the baculovirus-insect cell system."</p> <p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 267, no. 5, 1992, pages 24223-24229, XP002051156 cited in the application see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	17-32
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">19 January 1998</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">19.01.1998</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Hoekstra, S</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/00892

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TOSHITANI, KOJI ET AL: "Expression of a single chain HLA class I molecule in a human cell line: presentation of exogenous peptide and processed antigen to cytotoxic T lymphocytes" PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A. (1996), 93(1), 236-40 CODEN: PNASA6; ISSN: 0027-8424, XP002051157 see the whole document ---	17-32
X	WO 96 05287 A (ANERGEN INC) 22 February 1996 see claim 1 ---	6,7
Y	see the whole document ---	1-32
Y	WO 95 35500 A (LUDWIG INST CANCER RES) 28 December 1995 see the whole document ---	1-32
P,X	WO 96 26962 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 6 September 1996 see page 13, line 6 ---	6,7
P,X	see the whole document ---	17-32
P,X	WO 96 36881 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH ;BAROUCH DAN HUNG (GB); VESSEY STEPHEN JO) 21 November 1996 see the whole document ---	17-32
A	WO 94 23067 A (ABBOTT LAB) 13 October 1994 see the whole document ---	1-32
A	WO 95 33995 A (GTI) 14 December 1995 see the whole document -----	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 97/00892

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see supplemental sheet continuation of information PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6 4(a)

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 97 /00892

Observation : Insofar as claims 10, 11, 22, 26, 30 and 32 concern a method for the treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the effects attributed to the product/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/00892

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9605287 A	22-02-96	US 5595881 A	21-01-97
WO 9535500 A	28-12-95	AU 2828995 A	15-01-96
		CA 2192562 A	28-12-95
		EP 0767911 A	16-04-97
		FI 965038 A	16-12-96
		NO 965347 A	17-12-96
		ZA 9504986 A	17-05-96
WO 9626962 A	06-09-96	US 5635363 A	03-06-97
		CA 2212747 A	06-09-96
		EP 0812331 A	17-12-97
WO 9636881 A	21-11-96	AU 5769096 A	29-11-96
WO 9423067 A	13-10-94	AU 6496094 A	24-10-94
WO 9533995 A	14-12-95	US 5514557 A	07-05-96

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche internationale No
PCT/FR 97/00892

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 G01N33/569 G01N33/574 C07K14/705

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 G01N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	F. GODEAU ET AL.: "Purification and ligand binding of a soluble class I major histocompatibility complex molecule consisting of the first three domains of H-2Kd fused to beta2-microglobulin expressed in the baculovirus-insect cell system." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 267, no. 5, 1992, pages 24223-24229. XP002051156 cité dans la demande voir le document en entier --- -/--	17-32

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

Catégories spéciales de documents cités

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 janvier 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

19.01.98

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+31-70) 340-2040 Tlx 31 651 epo nl.
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hoekstra, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 97/00892

C. (suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	TOSHITANI, KOJI ET AL: "Expression of a single chain HLA class I molecule in a human cell line: presentation of exogenous peptide and processed antigen to cytotoxic T lymphocytes" PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A. (1996), 93(1), 236-40 CODEN: PNASA6; ISSN: 0027-8424, XP002051157 voir le document en entier ---	17-32
X	WO 96 05287 A (ANERGEN INC) 22 février 1996 voir revendication 1	6,7
Y	voir le document en entier ---	1-32
Y	WO 95 35500 A (LUDWIG INST CANCER RES) 28 décembre 1995 voir le document en entier ---	1-32
P,X	WO 96 26962 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 6 septembre 1996 voir page 13, ligne 6	6,7
P,X	voir le document en entier ---	17-32
P,X	WO 96 36881 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH ; BAROUCH DAN HUNG (GB); VESSEY STEPHEN JO) 21 novembre 1996 voir le document en entier ---	17-32
A	WO 94 23067 A (ABBOTT LAB) 13 octobre 1994 voir le document en entier ---	1-32
A	WO 95 33995 A (GTI) 14 décembre 1995 voir le document en entier -----	1-32

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ande internationale n°
PCT/FR 97/00892

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
2. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No. PCT/FR 97/00892

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDQUES SUR PCT/ISA/ 210

Remarque : Pour autant que les revendications 10,11,22,26,30 et 32 concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Recherche internationale No

PCT/FR 97/00892

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9605287 A	22-02-96	US 5595881 A	21-01-97
WO 9535500 A	28-12-95	AU 2828995 A	15-01-96
		CA 2192562 A	28-12-95
		EP 0767911 A	16-04-97
		FI 965038 A	16-12-96
		NO 965347 A	17-12-96
		ZA 9504986 A	17-05-96
WO 9626962 A	06-09-96	US 5635363 A	03-06-97
		CA 2212747 A	06-09-96
		EP 0812331 A	17-12-97
WO 9636881 A	21-11-96	AU 5769096 A	29-11-96
WO 9423067 A	13-10-94	AU 6496094 A	24-10-94
WO 9533995 A	14-12-95	US 5514557 A	07-05-96